



Actividad oxidante del compuesto trinuclear de cobre
 $[Cu_3(R, R - CPSE)_3(H_2O)_3] \cdot 8H_2O$ como modelo funcional del centro activo de la
metaloenzima Ascorbato Oxidasa frente a L- ácido ascórbico

Didier Jair Gómez Cifuentes
1088013613

Universidad Tecnológica de Pereira
Facultad de tecnologías
Escuela de Química
Pereira 2015

Actividad oxidante del compuesto trinuclear de cobre
 $[Cu_3(R, R - CPSE)_3(H_2O)_3] \cdot 8H_2O$ como modelo funcional del centro activo de la
metaloenzima Ascorbato Oxidasa frente a L- ácido ascórbico

Didier Jair Gómez Cifuentes
1088013613

Trabajo para optar al título de Tecnólogo Químico

Director de tesis:
Dra. Yenny Patricia Ávila Torres

Universidad Tecnológica de Pereira
Facultad de tecnologías
Escuela de Química
Pereira 2015

NOTA DE ACEPTACIÓN DE TRABAJO DE GRADO

Actividad oxidante del compuesto trinuclear de cobre

$[Cu_3(R, R - CPSE)_3(H_2O)_3] \cdot 8H_2O$ como modelo funcional del centro activo de la metaloenzima Ascorbato Oxidasa frente a L- ácido ascórbico

Presentado por:

Didier Jair Gómez Cifuentes

Los suscritos director y jurado del presente trabajo de grado, una vez realizada la versión escrita y presenciado la sustentación oral, decidimos otorgar la nota de:

Con la connotación:

Para constancia firmamos en la ciudad de Pereira hoy:

Director:

Dra. YENNY PATRICIA ÁVILA

Jurado:

Firma

DEDICATORIA

A mis abuelos Flor María Cifuentes y Pascual de Jesús Correa, sin ustedes nada de esto sería posible, a mi madre Sandra Patricia Gómez y mi tía Diana Gómez.

Para Alejandro

AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento a la Dra Yenny Patricia Avila por toda su colaboración y disposición incondicional en el desarrollo del presente proyecto, por permitirme pertenecer a su grupo de investigación, sobre todo por brindarme su ayuda cuando más lo necesite.

Al laboratorio 211 de la Unidad de Estudios de Posgrado- Facultad de Química (UNAM) por la síntesis de los ligantes aminoalcoholes.

A Lina Marcela Giraldo por su experiencia y disponibilidad para llevar a cabo las medidas en el equipo HPLC y por su asesoría para mejorar la calidad de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

| | Pag |
|---|-----|
| DEDICATORIA..... | 4 |
| AGRADECIMIENTOS | 5 |
| TABLA DE CONTENIDO | 6 |
| INDICE DE TABLAS | 9 |
| INDICE DE FIGURAS | 10 |
| RESUMEN | 12 |
| ABSTRACT | 14 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 16 |
| 2. MARCO TEÓRICO..... | 17 |
| 2.1. ASCORBATO OXIDASA | 17 |
| 2.2. ÁCIDO ASCÓRBICO | 20 |
| 2.2.1. Estructura | 20 |
| 2.2.2. Estereoquímica..... | 21 |
| 2.2.3. Propiedades:..... | 22 |
| 2.2.4. Usos industriales | 23 |
| 2.2.5. Usos médicos | 24 |
| 2.3. ÁCIDO DEHIDROASCÓRBICO (DHA)..... | 24 |
| 2.3.1. Estructura | 24 |
| 2.3.2. Propiedades antioxidantes del ácido dehidroascórbico | 24 |
| 2.3.3. Caracterización Ácido ascórbico/Ácido Dehidroascórbico | 25 |
| QCOAMMSB | 6 |

| | |
|---|----|
| 2.3.3.2. Ultravioleta | 27 |
| 2.4. COMPUESTOS DE COORDINACIÓN /SÍNTESIS | 27 |
| 2.4.1. Definición | 27 |
| 2.4.2. Clasificación de los Ligandos..... | 27 |
| 2.4.3. Síntesis de compuestos de coordinación..... | 28 |
| 2.4.4. Compuesto de coordinación de cobre (II) | 28 |
| 2.5. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE | 30 |
| 2.6. FUNDAMENTO TEÓRICO DE LA TÉCNICA UTILIZADA | 31 |
| 2.6.1. Generalidades de cromatografía | 31 |
| 2.6.2. Cromatografía Líquida alta eficiencia (HPLC)..... | 31 |
| 2.6.4. Instrumentación para Cromatografía de alta eficiencia..... | 32 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 34 |
| 4. OBJETIVOS | 36 |
| 4.1. OBJETIVO GENERAL | 36 |
| 4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS..... | 36 |
| 5. MATERIALES Y METODOS | 37 |
| 5.1. MATERIALES | 37 |
| 5.1.1. Reactivos | 37 |
| 5.1.2. Materiales y equipos..... | 37 |
| 5.1.3. Muestra de análisis..... | 37 |
| 5.1.4. Síntesis compuesto trinuclear..... | 38 |
| 5.2. METODOS..... | 38 |
| 5.2.1. Síntesis compuesto trinuclear..... | 38 |
| 5.2.2. Cinética ácido ascórbico | 41 |

| | |
|--|----|
| 5.2.3. Catálisis del ácido ascórbico (Actividad antioxidante) | 41 |
| 5.2.5. Acción compuesto trinuclear de cobre | 44 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 45 |
| 6.1. Estabilidad del ácido ascórbico a diferente pH, temperatura, foto degradación y disolvente | 45 |
| 6.1.1. Exposición Lumínica | 45 |
| 6.1.2. Estabilidad con la temperatura de AA | 46 |
| 6.1.3. Estabilidad con el pH. | 47 |
| 6.2. Determinación de las especies monodehidroascorbato y dehidroascorbato a partir de la reacción química con el agente oxidante H_2O_2 | 49 |
| 6.3. Catálisis de AA a DHA utilizando el compuesto trinuclear de cobre (TC) como modelo funcional de <i>ascorbato oxidasa</i> | 51 |
| 6.4. Estudio cinético de AA con TC | 58 |
| 6.5. Cuantificación Ácido ascórbico. | 59 |
| 6.6. Parámetros de detección. | 61 |
| CONCLUSIONES | 63 |
| BIBLIOGRAFIA | 64 |

INDICE DE TABLAS

| | Pag |
|---|-----|
| Tabla 1: Propiedades Físicas Ácido ascórbico (Estupiñan 2012) | 22 |
| Tabla 2: Vibraciones características del AA..... | 25 |
| Tabla 3: Vibraciones características del DHA..... | 25 |
| Tabla 4: Características instrumentales..... | 37 |
| Tabla 5: Análisis Elemental del compuesto $[Cu(R,R(-)Hcpse)_2] \cdot 2H_2O$ | 39 |
| Tabla 6: Análisis Elemental del compuesto $[Cu(R,R(-)Hcpse)_2] \cdot 2H_2O$ | 39 |
| Tabla 7: Patrones Curva de calibración Ácido ascórbico | 44 |
| Tabla 8: Condiciones sistema cromatografico HPLC | 51 |
| Tabla 9: % de Oxidación en términos de relación de áreas (AA-DHA)/AA a 265 nm | 55 |
| Tabla 10: Relación de áreas en la oxidación de AA por efecto de TC en condiciones óptimas..... | 57 |
| Tabla 11: Límite de detección y límite de cuantificación | 61 |

INDICE DE FIGURAS

| | Pag |
|--|-----|
| Figura 1: Esquema de la estructura del sitio activo de la ascorbato oxidasa Calabacita(Casella et al. 1999) | 18 |
| Figura 2: Estructura tridimensional de ascorbato oxidasa Calabacita (Casella et al. 1999) | 18 |
| Figura 3: Reacción catalizada por Ascorbato Oxidasa (Herrera 2006) | 20 |
| Figura 4: Estructura molecular del ácido ascórbico (Perez 2008) | 21 |
| Figura 5: Estructura molecular del ácido dehidroascórbico (Deutsch 2000) | 24 |
| Figura 6: Espectro Infrarrojo teórico de Ácido Dehidroascórbico obtenido en disco Nujol (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology 2015)...26 | |
| Figura 7: Espectro Infrarrojo Ácido Ascórbico,(National Institute of Advanced Industrial Science and Technology 2015). | 26 |
| Figura 8: Reacción de N- [2-hidroxi-1(S)-metil-2(S)-fenietil]-N-metilglicina (S,S(+))H ₂ cpse con ácido fenilborónico..... | 29 |
| Figura 9: Diagrama de Ortep correspondiente a la difracción de rayos-x de monocristal de Cu ₃ R, R – CPSE3H ₂ O ₃ .8H ₂ O(Ávila-Torres et al. 2013). | 30 |
| Figura 10: Reacción catalizada por ascorbato oxidasa. | 30 |
| Figura 11: Equipo para cromatografía líquida de alta eficiencia..... | 33 |
| Figura 12: Esquema de reacción de síntesis del compuesto trinuclear de cobre(II)..... | 38 |
| Figura 13: Proceso de síntesis compuesto trinuclear de cobre (Avila T. Yenny).40 | |
| Figura 14: Grupos funcionales del ácido ascórbico..... | 42 |
| Figura 15 : Tautomerismo en ácido ascórbico..... | 42 |
| Figura 16: Estructura de Monodehidroascorbato. | 43 |
| Figura 17: Ácido ascórbico interferencia lumínica. | 45 |
| Figura 18: Curva cinética de AA con LnC vs. T..... | 46 |
| Figura 19: Cinética Ácido ascórbico a 10 °C. | 47 |
| Figura 20: Medio neutro con buffer fosfato a pH=6.4. | 48 |

| | |
|--|----|
| Figura 21: Medio ácido con ácido ortofosfórico a pH= 3.0. | 48 |
| Figura 22: Medio básico con NaHCO ₃ a pH=8.0. | 49 |
| Figura 23: Espectro IR Ácido ascórbico comparación reacción con H ₂ O ₂ | 50 |
| Figura 24: Deconvolución perfiles Cromatográficos. | 52 |
| Figura 25: Perfil cromatográfico correspondiente al efecto de TC sobre AA a a) 265 nm. b) a 220 nm, c) Control de AA. | 54 |
| Figura 26: Perfil cromatográfico de la degradación de AA con TC a diferentes proporciones en condiciones óptimas. (Fase móvil: buffer fosfato, reacción estabilizada con ácido ortofosfórico, 10 °C, etanol como disolvente)..... | 56 |
| Figura 27: Cinética de la reacción de oxidación de AA a. Ln C vs. t | 58 |
| Figura 28: Cinética de la reacción de oxidación de AA a. 1/ C vs. t | 58 |
| Figura 29: Cinética de la reacción de oxidación de AA . 1/C ² vs. t | 59 |
| Figura 30: Relación tiempos de retención-área curva de calibración ácido ascórbico. | 60 |
| Figura 31: Concentración Vs Área Curva de calibración ácido ascórbico. | 60 |

RESUMEN

Los compuestos de coordinación están siendo estudiados a lo largo de los últimos años, presentando grandes avances en campos como la metalurgia, análisis químicos y en el campo de la biología. En este último, los compuestos de coordinación han permitido el avance en la síntesis de modelos biomiméticos funcionales o estructurales de los sitios activos de metaloenzimas.

Los metales de transición como hierro, zinc y cobre a menudo son componentes claves de los sitios activos de las enzimas. En el caso concreto del cobre es posible encontrarlo en metaloenzimas producidas tanto por animales como plantas cumpliendo diferentes funciones, tales como: transferencia de electrones (*azurina*, *plastocianina*), reacciones de oxigenación (*ascorbato oxidasa*), transporte de oxígeno (*hemocianina*). (Ballesteros, 2013)

Como modelos estructurales de *ascorbato oxidasa* se sintetizó en 2013 un compuesto trinuclear de cobre (II). Este se llevó a cabo a partir de una síntesis asincrónica simultánea. Esto implica la desprotonación del grupo alcohol del sistema mononuclear de cobre(II) con el ligante N-acetil R,R(H₂cpse) y la activación asociativa del mismo sobre la sal metálica de acetato de cobre. (Avila-Torres, 2013). Fueron evaluadas las propiedades magnéticas en el reporte previo, pero no la actividad biológica y su potencial aplicación como modelo funcional.

En este contexto, el presente proyecto de investigación tuvo como objetivo evaluar la catálisis por parte del compuesto trinuclear de cobre, estableciendo patrones de concentración de 1×10^{-3} M de ácido ascórbico y $4,84 \times 10^{-4}$ de $[Cu_3(R, R - CPSE)_3(H_2O)_3] \cdot 8H_2O$, realizando seguimientos en espectrofotometría UV-visible y espectroscopia Infrarroja.

Finalmente, se logró demostrar de forma cualitativa y cuantitativa que el compuesto trinuclear de cobre, sirve como catalizador del ácido ascórbico, ya que se observó una disminución en la concentración del ácido una vez se realizó el seguimiento fotométrico a 220 nm y 265 nm.

Palabras clave: Compuesto trinuclear de cobre, ascorbato oxidasa, catálisis, metaloenzimas.

ABSTRACT

Coordination compounds are being studied over the past years, with major advances in fields such as metallurgy, chemical analysis and the field of biology. In the latter, coordination compounds have allowed progress in the synthesis of functional or structural biomimetic models of active site of metalloenzymes.

Transition metals such as iron, zinc and copper are often key of the active sites of the enzymes components. In the case, copper(II) is possible to find in metalloenzymes produced by animals and plants in different roles, such as: Electron transfer (azurin, plastocyanin), oxygenation reactions (ascorbate oxidase), transport of oxygen (hemocyanin) (Ballesteros , 2013).

As structural models of ascorbate oxidase was synthesized in 2013, a trinuclear copper compound (II). This was done from a simultaneous asynchronous synthesis. This involves the deprotonation of the alcohol group of system mononuclear copper (II) with N-acetyl ligand R, R (H₂cpse) and associative activation thereof on the metal salt of copper acetate. (Avila-Torres, 2013). Previously, the magnetic properties were evaluated but the biological properties they have not yet been evaluated.

In this context, this research project was to evaluate the catalysis by the trinuclear copper compound, establishing patterns of concentration 1×10^{-3} M ascorbic acid and, $4,84 \times 10^{-4}$ of $[Cu_3(R, R - CPSE)_3(H_2O)_3] \cdot 8H_2O$ performing monitoring in UV-visible spectroscopy and infrared spectroscopy.

Finally, it was possible to demonstrate qualitatively and quantitatively the trinuclear copper compound promotes as a catalyst for ascorbic acid. There is a decrease in the concentration of the ascorbic acid as consequence of trinuclear copper(II) monitoring at 220 nm and 265 nm was observed.

Keywords: *Trinuclear copper compound; ascorbate oxidase; catalysis, metalloenzymes.*

1. INTRODUCCIÓN

Una gran variedad de metaloenzimas que contienen cobre son producidas en las plantas y animales, se utilizan para la transferencia de electrones, reacciones de oxigenación y transporte de oxígeno. La enzima *ascorbato oxidasa* que es de interés en el presente trabajo es quien realiza trabajos como reacciones de oxigenación.

La enzima *ascorbato oxidasa* es el catalizador del ácido ascórbico (AA), permitiendo su degradación a ácido dehidroascorbico (DHA), el ascorbato presenta gran importancia a nivel celular cumpliendo funciones de protección frente a radicales libre y el estrés oxidativo.

La química Bioinorgánica se ha preocupado por sintetizar modelos biomiméticos que permitan emular los centros activos de las metaloenzimas. El compuesto trinuclear de cobre $[Cu_3(R,R-CPSE)_3(H_2O)_3] \cdot 8H_2O$ posee una relación estructural con el centro activo de la enzima *ascorbato oxidasa* por tanto se estudiará la funcionalidad de dicho compuesto frente al ácido ascórbico.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. ASCORBATO OXIDASA

El cobre en sus formas iónicas hace parte de los seres vivos desde la aparición del oxígeno atmosférico. La ausencia de proteínas de cobre en los **archaea anaeróbicos** aunando en el análisis de reacciones catalizadas por proteínas azules, donde el oxígeno participa como sustrato; así como la toxicidad del cobre para organismos inferiores, manifiestan el estrecho margen de concentración metabólica admisible para muchas especies que podría deberse a la tardía incorporación bioquímica del cobre a los seres vivos. Las proteínas que contienen cobre se clasifican tradicionalmente en función del tipo de centro activo que poseen o al tipo de complejo que forma el metal y los restos aminoácidos unidos a él.

Sobre esta base experimental se identificaron tres tipos de centros que se denominaron cobre tipo 1, 2 y 3.(Benavente 2007)(Mancisidor 2013).

Cobre tipo 1: Presenta Disposición Tetraédrica, este puede ser encontrado en proteínas azules de cobre, *Plastocianina*, *Azurina*, *Amiacina* etc. El **Cobre tipo 2:** Presenta geometría plano cuadrado y puede ser encontrado en enzimas como *Nitrito reductasa*, *Superoxido Dismutasa*, *Amino oxidasa* y *Galactoxidasa*. El **Cobre tipo 3** con un centro dinuclear conformado por dos pirámides trigonales opuestas, cuya estructura la presentan la *Hemocianina* y por último se encuentra un subgrupo el **Cobre tipo 4** cuyo centro trinuclear es una unión entre el cobre del tipo 2 y 3 encontrando en esta familia a la enzima *ascorbato oxidasa*, *lacasa* y *ceruplasmina*, **figura 1**.(S.Al-Madhoun 2003).

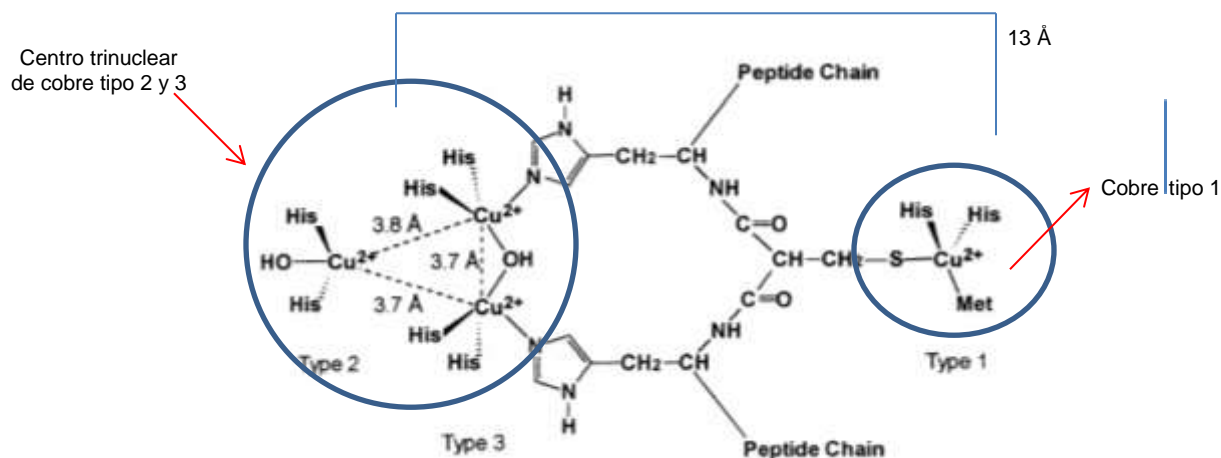


Figura 1: Esquema de la estructura del sitio activo de la ascorbato oxidasa Calabacita (Casella et al. 1999)

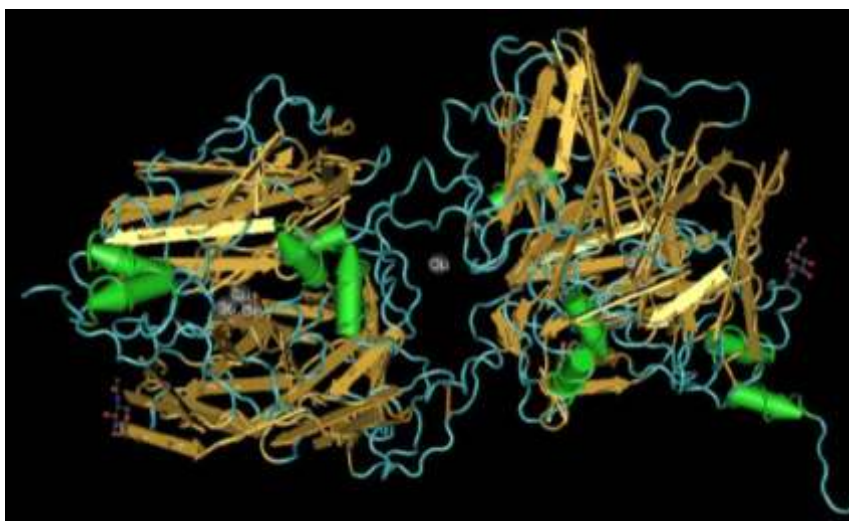


Figura 2: Estructura tridimensional de ascorbato oxidasa Calabacita (Casella et al. 1999)

La ascorbato oxidasa es encontrada en plantas y bacterias, se purifica comúnmente del calabacín verde (*Cucurbita pepo medullosa*) o del pepino (*Cucumis sativus*) (Casella et al. 1999) esta metaloproteína pertenece al grupo de

las oxidasas azules de cobre formando enzimas que contienen uno o más centros de Cobre tipo 1 y un centro trinuclear de cobre tipo 4 como se mostró en la figura anterior. Tiene el nombre sistemático L-ascorbato:oxígeno oxidoreductasa. Las distancias interatómicas alrededor de 3.4 Å en el centro trinuclear proporcionan un arreglo triangular. La estructura de la enzima Ascorbato oxidasa tiene unido al centro trinuclear de cobre un grupo hidroxilo y se observa que la coordinación a la estructura peptídica es a través de Histidina, Cisteína y Metionina. Contiene además Manosa, Xilosa y N-acetilglucosamina, con una masa molecular de 140 KDa, la enzima tiene la propiedad de absorber luz a los 610 nm y formar una banda azul en el espectro electrónico.

La función de la enzima *ascorbato oxidasa* ha sido ampliamente investigada, se ha demostrado que ha mayor actividad por parte de la enzima, se obtiene un mayor crecimiento celular dado que se estimula el crecimiento mediante la vacuolización y la absorción de iones. (Hidalgo and Gonzalez-Reyes 1989)

En el desarrollo de plantas como el tabaco y la cebolla se ha visto que la enzima *ascorbato oxidasa* juega un papel importante en el control del estado redox del apoplasto e inclusive, en la regulación de la disponibilidad de oxígeno en las células. (Pignocchi and Foyer 2003)

La *ascorbato oxidasa* (AO) actúa sobre el ácido L-ascórbico (AA) o vitamina C, el antioxidante más abundante en los tejidos vegetales. Su concentración es del orden de milimolar. A nivel celular, el AA se encuentra en el citosol, cloroplastos, vacuolas, mitocondrias y apoplastos. Sus niveles son especialmente elevados en el citosol y en los cloroplastos; su concentración oscila entre 10 y 20 mM, respectivamente (Pastori et al. 2003) (Smirnoff 2000). La acción catalizada por (AO) sobre AA y O₂ permite la producción de 2-Dehidroascorbato + 2 H₂O. (Al-Madhoun, Sanmartin, and Kanellis 2003), los cuales constituyen las dos formas oxidadas del AA.

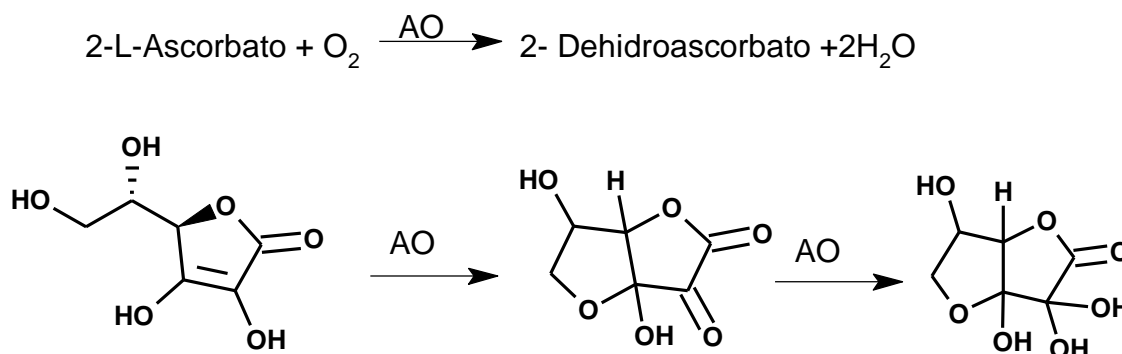
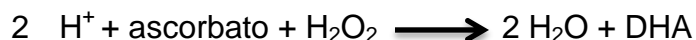


Figura 3: Reacción catalizada por Ascorbato Oxidasa (Herrera 2006)

La función de AO implica que el cobre tipo 1 es el responsable del color azul, el cobre tipo 2 es el responsable de la actividad catalítica y de las fuertes interacciones con los inhibidores químicos, y se atribuye al cobre tipo 3 la recepción de electrones que se une a la molécula de ácido ascórbico durante su oxidación.

Otra reacción que es de interés antioxidante de AA es la siguiente:

- El Ascorbato también es un secuestrador eficiente del oxígeno singlete y es capaz de reaccionar con los radicales $\cdot\text{OH}$ y con el peróxido de hidrógeno, según la reacción:



2.2. ÁCIDO ASCÓRBICO

2.2.1. Estructura

El ácido ascórbico es un ácido de azúcar con propiedades antioxidantes, está relacionado con los azúcares de C6. El (R)-3,4-dihidroxi-5-((S)-1,2-dihidroxietil) furano-2(5H)-ona (nombre IUPAC), contiene varios elementos estructurales que contribuyen a su comportamiento químico: la estructura de la

lactona y dos grupos hidroxilos enólicos, así como un grupo alcohol primario y secundario, La estructura endiol motiva sus cualidades antioxidantes, ya que los endioles pueden ser oxidables fácilmente a dicetonas. (Rucker, Morris, and Fascetti 2008)

El ácido ascórbico forma dos enlaces de puentes de hidrógeno intramoleculares que contribuyen de manera decisiva a la estabilidad, y con eso a las cualidades químicas de la estructura endiol. (Perez 2008)

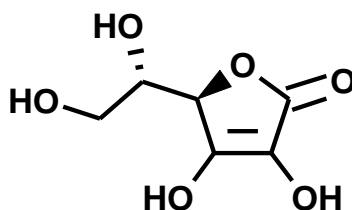


Figura 4: Estructura molecular del ácido ascórbico (Perez 2008)

2.2.2. Estereoquímica

El ácido ascórbico existe en 4 formas estereoisómeras diferentes que muestran actividad óptica

- Ácido L-ascórbico
- Ácido D-ascórbico
- Ácido L-isoascórbico
- Ácido D-isoascórbico

Las moléculas L- y D- son enantiómeras entre sí. A pesar de estas pequeñas diferencias, los estereoisómeros del ácido ascórbico son inactivos en el organismo, dado que las enzimas reconocen estereoespecíficamente al L-ascórbico. El D-isoascórbico solo presenta un pequeño efecto. (Perez 2008)

2.2.3. Propiedades:

2.2.3.1. Físicas

Tabla 1: Propiedades Físicas Ácido ascórbico (Estupiñan 2012)

| Propiedad | Descripción |
|---|---|
| Apariencia | Sólido cristalino blanco, inodoro, con sabor ácido fuerte |
| Fórmula/ gmol masa | $C_6H_8O_6$ /176,13 |
| Punto de ebullición (°C) | 190-192 |
| Densidad: gmL^{-1}) | 1,65 |
| Ph | 3(5 gmL^{-1}),2(50 gmL^{-1}) |
| pK1 | 4,17 |
| Pk2 | 11,57 |
| Potencial redox | Primera etapa:E10 |
| Solubilidad | |
| Agua | 0,33 |
| 95% Etanol | 0,033 |
| Glicerol | 0,01 |
| Grasas y aceites | Insoluble |
| Propiedades espectrales ultra violeta (UV) | |
| pH 2 | $E_{max}(1\%,1cm)$ 695 a 245 nm sin disociar |
| pH 6,4 | $E_{max}(1\%,1cm)$ 940 a 265 nm (forma disociada) |

2.2.3.2. Químicas

Función Biológica

El ácido ascórbico desempeña un papel clave en la defensa contra el estrés oxidativo y es particularmente abundante en tejidos fotosintéticos (Smirnoff 2000). El ácido ascórbico se localiza en el citoplasma, pero una proporción sustancial se exporta hacia el apoplasto, en donde se encuentra presente en el orden milimolar. El ácido ascórbico presenta la primera línea de defensa contra los oxidantes externos entre los que se encuentra el ozono (O_3) el dióxido de azufre (SO_2) y el dióxido de Nitrógeno (NO_2) (Plöchl et al. 2000).

El ácido ascórbico se oxida a monodehidroascorbato (MDHA) por la enzima oxidasa de ascorbato (AO). MDHA es un radical inestable y rápidamente desproporciona para producir DHA, este último es transportado hacia el citosol a través de la membrana plasmática.(Horemans, Foyer, and Asard 2000).

2.2.4. Usos industriales

Por sus características es empleado como agente antioxidante, regulador de color, regulador de acidez y conservante, también es adicionado como suplemento alimenticio. Su empleo como antioxidante ayuda a prolongar la vida útil de los alimentos protegiéndolos del deterioro que causa la oxidación. El ácido ascórbico y sus sales de sodio y potasio son muy utilizadas para evitar la oxidación, en el caso de las grasas son utilizadas los esteres del ácido ascórbico como es el caso del estereato de ascorbilo para evitar problemas como la rancidez de las grasas o aceites.(Health and Consumers Directorate - General 2003).

Dentro de las aplicaciones más comunes Bebidas de frutas, Néctares, Panificación, Vitaminas y suplementos vitamínicos, Productos cárnicos, dulces.

2.2.5. Usos médicos

La vitamina C es esencial para la formación y mantenimiento del material intercelular. En el escorbuto, enfermedad causada por la deficiencia de vitamina C en la alimentación, produciendo que los vasos sanguíneos y los capilares carezcan de solidez, cuando estos sufren hemorragias. De esta manera se inicia un tratamiento que permite recuperar vitamina C mediante ingesta directa de ácido ascórbico (250 mg) vía oral (Latham 2002).

2.3. ÁCIDO DEHIDROASCÓRBICO (DHA)

2.3.1. Estructura

El ácido dehidroascórbico (DHA por sus siglas en inglés) es un importante compuesto en los sistemas biológicos, es la forma oxidada del ácido ascórbico (Vitamina C), ambos compuestos son importantes en varios componentes de la dieta humana. El (5R)-5-[(1S)-1,2-dihidroietil]oxolana-2,3,4-triona (Nombre IUPAC) juega un papel importante en muchos tipos de células ya que puede ser utilizado para obtener AA. (Wilson 2002).

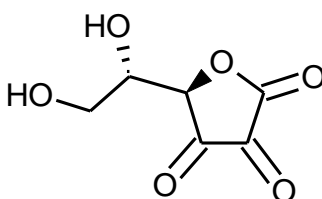


Figura 5: Estructura molecular del ácido dehidroascórbico (Deutsch 2000)

2.3.2. Propiedades antioxidantes del ácido dehidroascórbico

El ácido dehidroascórbico posee propiedades antioxidantes, a pesar de que el ácido ascórbico es el antioxidante más abundante se ha demostrado que el DHA es mejor que el AA protegiendo las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación a causa del ion cúprico demostrándose que la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ del

C-DHA está estrechamente relacionada con la actividad anteriormente expuesta.(Deutsch 2000).

2.3.3. Caracterización Ácido ascórbico/Ácido Dehidroascórbico

2.3.3.1. Espectroscopia Infrarrojo

Dada las similitudes estructurales entre AA y DHA una de las maneras de lograr una buena caracterización es mediante la toma de un espectro de Infrarrojo. El espectro de DHA muestra una fuerte absorbancia a los 1784 cm^{-1} perteneciente al enlace $\text{C}=\text{O}$, en 3297 cm^{-1} y 3618 pertenecen al enlace $\text{O}-\text{H}$. Por otro lado el ácido ascórbico muestra su banda característica $\text{C}=\text{O}$ en 1754 cm^{-1} y una absorbancia fuerte en los 1673 cm^{-1} el enlace $\text{O}-\text{H}$ muestra su absorbancia respectiva en 3626 , 3410 , 3316 y 3217 cm^{-1} .(Deutsch 2000)

Tabla 2: Vibraciones características del AA

| cm^{-1} | Trans. | cm^{-1} | Trans. | cm^{-1} | Trans. | cm^{-1} | Trans. | cm^{-1} | Trans. |
|------------------|--------|------------------|--------|------------------|--------|------------------|--------|------------------|--------|
| 3626 | 49 | 2864 | 13 | 1355 | 55 | 1121 | 36 | 871 | 70 |
| 3410 | 47 | 2726 | 58 | 1321 | 38 | 1113 | 38 | 821 | 64 |
| 3316 | 50 | 1754 | 58 | 1277 | 49 | 1077 | 58 | 757 | 58 |
| 3217 | 55 | 1673 | 29 | 1248 | 64 | 1068 | 60 | 722 | 68 |
| 2955 | 11 | 1497 | 66 | 1223 | 60 | 1045 | 60 | 716 | 74 |
| 2925 | 4 | 1452 | 41 | 1199 | 80 | 1027 | 31 | 685 | 72 |
| 2869 | 20 | 1378 | 50 | 1141 | 36 | 990 | 52 | 629 | 74 |

Tabla 3: Vibraciones características del DHA

| cm^{-1} | Trans. | cm^{-1} | Trans. | cm^{-1} | Trans. | cm^{-1} | Trans. | cm^{-1} | Transm. |
|------------------|--------|------------------|--------|------------------|--------|------------------|--------|------------------|---------|
| 3618 | 37 | 1782 | 28 | 1281 | 72 | 1108 | 45 | 988 | 60 |
| 3297 | 43 | 1460 | 43 | 1257 | 62 | 1097 | 41 | 818 | 70 |
| 2995 | 49 | 1413 | 77 | 1228 | 47 | 1066 | 50 | 792 | 70 |
| 2955 | 12 | 1377 | 67 | 1201 | 67 | 1074 | 46 | 745 | 70 |
| 2924 | 4 | 1366 | 44 | 1158 | 34 | 1053 | 38 | 701 | 72 |
| 2866 | 22 | 1322 | 65 | 1143 | 49 | 1033 | 25 | 631 | 74 |
| 2854 | 13 | 1289 | 66 | 1134 | 60 | 1023 | 31 | 584 | 72 |

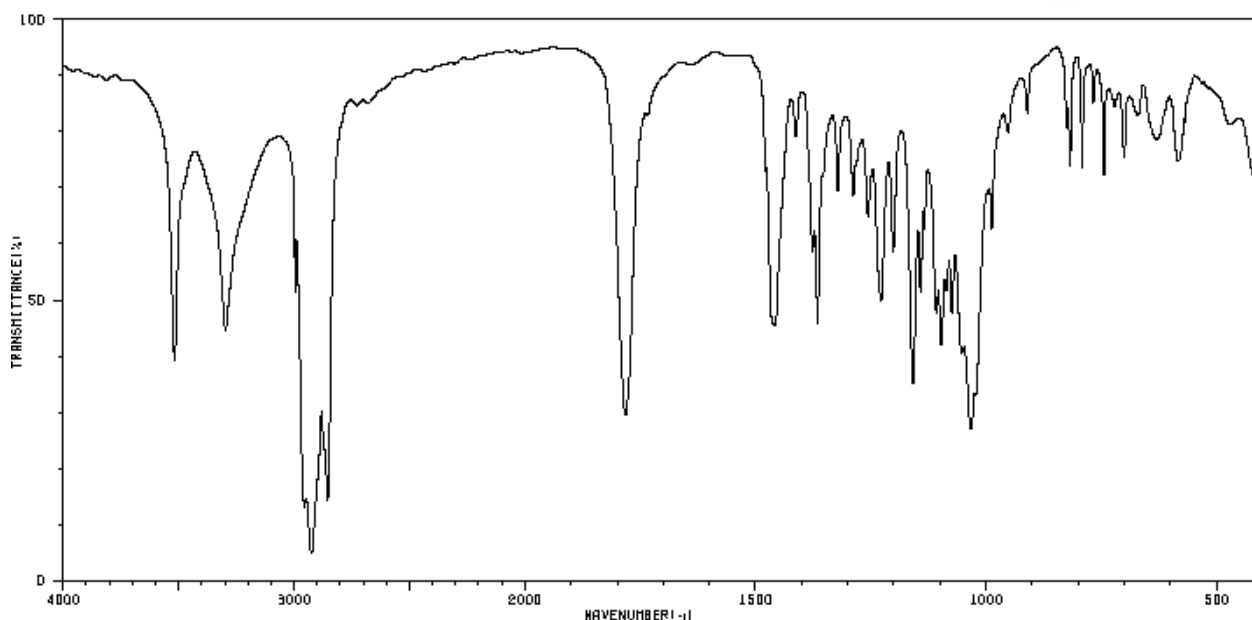


Figura 6: Espectro Infrarrojo teórico de Ácido Dehidroascórbico obtenido en disco Nujol (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology 2015).

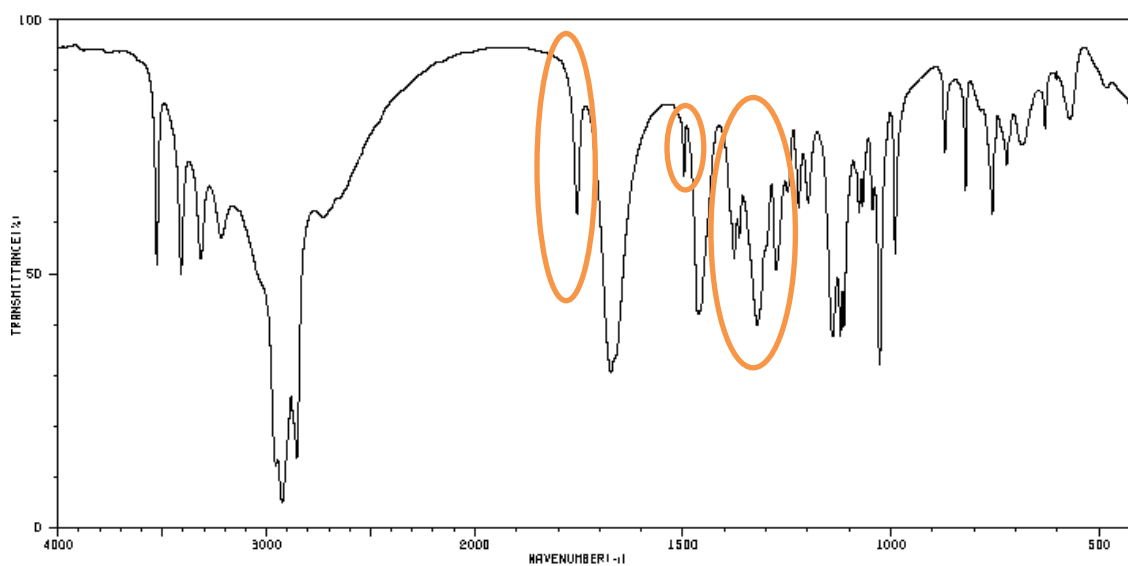


Figura 7: Espectro Infrarrojo Ácido Ascórbico, (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology 2015).

2.3.3.2. Ultravioleta

El ácido dehidroascórbico posee su longitud de onda de máxima absorción a 185 mn y otra poco intensa a 220 nm. En contra parte el ácido ascórbico posee una fuerte absorción a 265 nm. Esta diferencia en longitudes de onda permite hacer un seguimiento espectrofotométrico de las dos especies, DHA y AA. (Deutsch 2000).

2.4. COMPUESTOS DE COORDINACIÓN /SÍNTESIS

2.4.1. Definición

Un complejo o compuesto de coordinación es el resultado de la interacción de un átomo central (un ion metálico con orbitales de valencia vacíos actuando como ácido de Lewis) y una o varias bases de Lewis con pares de electrones libres, que se conocen como agentes complejantes o ligandos. Esta interacción lleva a la formación de un enlace covalente coordinado o dativo.

2.4.2. Clasificación de los Ligandos

Con base al número de átomos directamente unidos al átomo central, se pueden clasificar como: monodentados (un par electrónico libre), bidentados, tridentados o polidentados.

Los ligandos polidentados se denominan ligandos quelatos porque al unirse al átomo central actúan como una pinza que forma un anillo, llamado anillo quelato el cual da estabilidad al compuesto de coordinación.

Con base al tipo de enlace que establecen con el átomo metálico la naturaleza del enlace puede considerarse como:

- a) Si no tienen disponibles electrones π y tampoco orbitales vacantes, se coordinan sólo a través del enlace σ
- b) Ligandos con dos o tres pares de electrones libres puede desdoblarse en un par de energía menor y formar un enlace σ , y los otros se convierten en pares electrónicos π , con una energía mayor.
- c) Ligandos que tienen pares electrónicos de enlace σ y orbitales π de anti enlace vacíos de baja energía, pueden aceptar electrones de orbitales “d” del metal.

2.4.3. Síntesis de compuestos de coordinación

En términos generales las reacciones en compuestos de coordinación se presentan por un mecanismo general asincrónico simultáneo. Implica la formación de un enlace al que sigue la ruptura de otro. El proceso es activado asociativamente y el intermedio que se forma tiene número de coordinación mayor que el complejo inicial. Este mecanismo activado disociativamente permite el rompimiento de enlaces M-X y la formación de enlaces M-Y. Algunos factores alteran este tipo de sustituciones como lo son: ley de velocidad, efecto de la carga del ion central, efecto del ligante entrante, efecto del ligante saliente, efecto de los ligantes inertes, valores de parámetros de activación y estereoquímica. (Ávila-torres, Huerta, and Barba-behrens 2013).

2.4.4. Compuesto de coordinación de cobre (II)

En 2013 Ávila- Torres y colaboradores reportaron la estructura de difracción de rayos-X del isómero *R,R* del ligante acetilado de pseudoefedrina con cobre(II). El ligante pseudoefedrina, con gran interés biológico hace parte de la familia de isómeros de adrenalina y epinefrina. A su vez, el derivado acetilado ha sido utilizado en reacciones enantio y estereoselectivas utilizando boro como ácido de Lewis, figura 8.

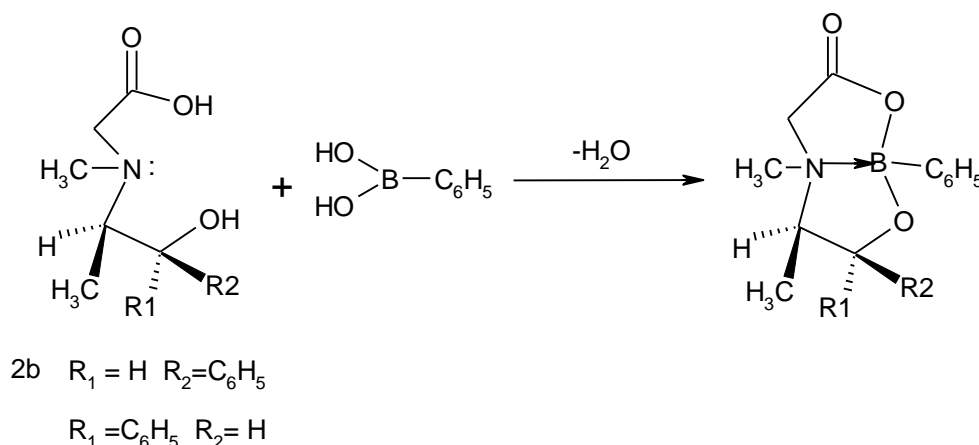


Figura 8: Reacción de *N*- [2-hidroxi-1(*S*)-metil-2(*S*)-fenietil]-*N*-metilglicina (*S,S*(+)*H*₂cpse con ácido fenilborónico.

La acetilación del ligante pseudoefedrina presenta una gran ventaja sintética ya que proporciona nuevos sitios de coordinación al adicionar un grupo carboxílico a la cadena carbonada, convirtiendo el ligante en tridentado; ideal para llevar a cabo reacciones de coordinación a centros metálicos.

Con el interés de estudiar las propiedades magnéticas el compuesto $[Cu_3(R,R - CPSE)_3(H_2O)_3] \cdot 8H_2O$ fue sintetizado, pero no se reporta la evaluación de las propiedades biológicas, dada su similitud estructural con la metaloenzima *ascorbato oxidasa*. La estructura cristalina que se muestra en la figura 9, posee un centro de simetría, cada átomo de cobre es pentacoordinado estabilizando una geometría de pirámide de base cuadrada. El ligando *R,R*(-)*H*₂CPSE se coordinó al metal en un plano ecuatorial por el nitrógeno con una distancia de cobre- nitrógeno de 2.010 Å, un oxígeno del grupo carboxílico en Cu1 - O3 1.983(3) Å y un oxígeno del grupo alcohol que actúa como puente entre centros metálicos de cobre constituyendo un anillo de seis miembros estable Cu₃O₃. Completando las cinco posiciones de coordinación se encuentra una molécula en la posición apical con una distancia Cu1 - O5 de 2.338 (4) Å (Ávila-Torres et al. 2013).

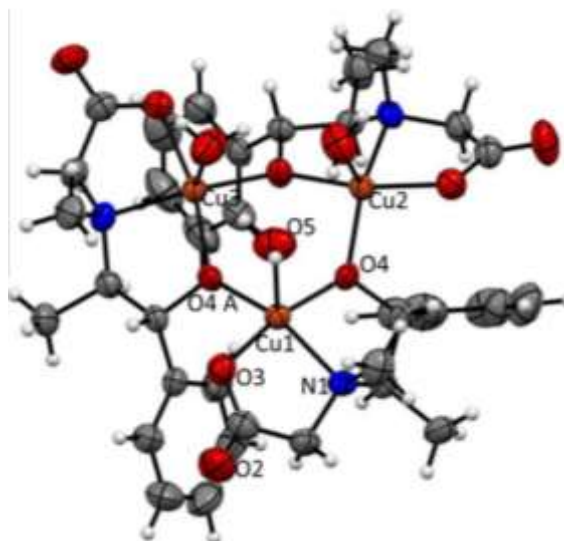


Figura 9: Diagrama de Ortep correspondiente a la difracción de rayos-x de monocristal de $[Cu_3(R,R - CPSE)_3(H_2O)_3] \cdot 8H_2O$ (Ávila-Torres et al. 2013).

2.5. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad *ascorbato oxidasa* se encuentra definida como la actividad correspondiente a la oxidación de 1 mM de ácido ascórbico por minuto, es decir la catálisis del ácido ascórbico a monodehidroascobato y posteriormente a 2-dehidroascorbato, figura 10 (Shimada 2008).

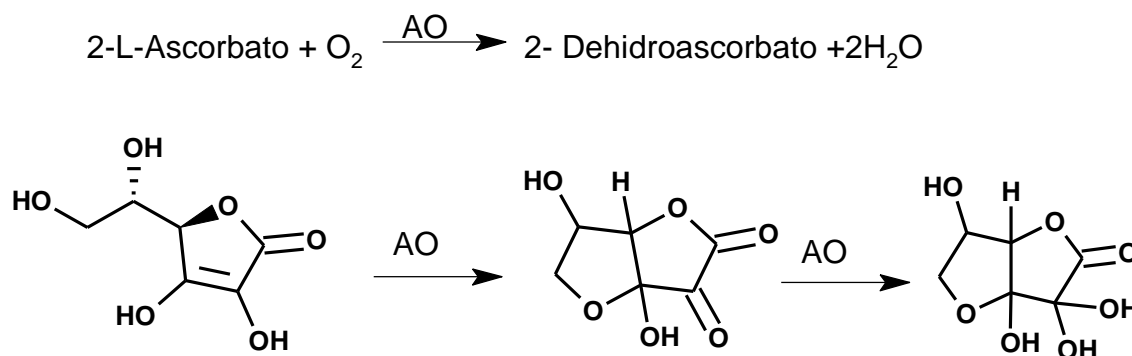


Figura 10: Reacción catalizada por ascorbato oxidasa.

2.6. FUNDAMENTO TEÓRICO DE LA TÉCNICA UTILIZADA

2.6.1. Generalidades de cromatografía

Es una técnica antigua, concebida inicialmente como método de separación, actualmente es utilizada en diferentes campos debido a su gran versatilidad del proceso ya que todo el método es llevado a cabo en función del tipo de molécula. El proceso cromatográfico contempla la separación de los componentes de una mezcla, los componentes serán disueltos en una fase móvil, la cual a su vez es impulsada a través de una fase inmóvil o como es conocida, fase estacionaria, la cual puede ser líquida o sólida. Las fases son escogidas de tal forma que los componentes de las muestras presenten diferencias en cuanto a sus propiedades físico-químicas (solubilidad, tamaño, fuerza iónica, polaridad etc.), (María and Pérez 2005).

2.6.2. Cromatografía Líquida alta eficiencia (HPLC)

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés) es una técnica analítica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica (Fase estacionaria), (Quattrocchi and Abelaira de 1992).

2.6.3. Cromatografía de adsorción (Líquido-sólido)

Se caracteriza por utilizar una fase estacionaria sólida (adsorbente) y una fase líquida (eluyente) apolar, en este tipo de cromatografía la fase estacionaria la constituye un sólido poroso finamente granulado siendo el proceso de adsorción debido a las atracciones intermoleculares dipolo-dipolo o puentes de hidrógeno entre los componentes de la muestra y el adsorbente, (Sevilla).

2.6.4. Instrumentación para Cromatografía de alta eficiencia

El cromatógrafo líquido se encuentra estructurado de la siguiente manera.

- Depósito de para fase móvil: El cual alimenta el sistema con el solvente o mezcla de solventes que constituye la fase móvil.
- Sistema de inyección: Son válvulas dosificadoras que permiten regular la aplicación de la muestra en volúmenes específicos.
- Sistemas de Bombeo: Son necesarios para regular tanto la presión como la velocidad de flujo de la fase móvil. El equipo *Hitachi* posee una bomba **L-2130**.
- Columna: Contiene las partículas de la fase estacionaria, el equipo *Hitachi* posee un sistema Columna-Horno **L-2300**.
- Detector: Es el sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna, las características deseadas para un detector es que tenga una sensibilidad adecuada, respuesta rápida e independiente del caudal, tiempos de respuesta corto, estabilidad y reproducibilidad. El equipo implementado *Hitachi* posee un detector **UV-Visible L-2420**.



Figura 11: Equipo para cromatografía líquida de alta eficiencia

Fuente: Del autor, Tomada en el laboratorio de la escuela de química, Universidad Tecnológica de Pereira

3. JUSTIFICACIÓN

En 2006, Palmira y colaboradores demostraron cómo se correlaciona de manera positiva la actividad de la enzima *ascorbato oxidasa* con el crecimiento de algunos órganos en la planta del fríjol, obteniendo que los órganos en etapa de madurez presentan mayor desarrollo por parte de la actividad de la enzima. Esto permite establecer que los procesos biológicos que involucran *ascorbato oxidasa* sean de gran interés, de esta manera da lugar a un estudio sistemático de modelos biomiméticos estructurales o funcionales de esta metaloproteína.

Como las reacciones de óxido- reducción que llevan las metaloproteínas son importantes para el desarrollo de los seres vivos, la química bioinorgánica se ha tomado la tarea de sintetizar modelos biomiméticos estructurales o funcionales que permitan describir el centro activo en metaloenzimas como la *ascorbato oxidasa*.

Ávila-Torres y colaboradores en 2013, reportaron una serie de compuestos polinucleares de cobre (II) derivados de aminoalcoholes. Dentro de estas estructuras depositadas en CCDC (Cambridge Crystallographic Data Centre), la estructura de difracción de rayos-X de monocristal de $[Cu_3(R,R - CPSE)_3(H_2O)_3] \cdot 8H_2O$, muestra un arreglo trinuclear de cobre con distancias interatómicas entre centros metálicos alrededor de 3.4 Å, con un puente oxo. Los ligantes que están coordinados son derivados de aminoalcoholes con estructuras químicas similares a aminoácidos y bases de Lewis como nitrógeno y oxígeno. El compuesto trinuclear de cobre (II) hace parte de un anillo de seis miembros estable Cu_3O_3 en conformación silla, con geometría pentacoordinada de pirámide de base cuadrada en cada centro metálico. Para esta familia de compuestos no existe un reporte bibliográfico sobre el estudio funcional a nivel catalítico u oxidativo del compuesto trinuclear de cobre

" $[Cu_3(CPSE)_3(H_2O)_3] \cdot 8H_2O$ " dada su relación estructural con metaloenzimas como la *ascorbato oxidasa*.

Dado este contexto el presente proyecto busca evaluar funcionalmente el compuesto trinuclear de cobre (II) frente al ácido ascórbico dada su similitud al centro activo de ascorbato oxidasa. La pregunta a responder es la siguiente:

¿El compuesto de coordinación $[Cu_3(R,R - CPSE)_3(H_2O)_3] \cdot 8H_2O$ es un modelo funcional del centro activo de la metaloenzima ascorbato oxidasa, frente a L-ácido ascórbico, utilizando un método de detección espectrofotométrico?

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la oxidación del sustrato L (+) ácido ascórbico a monodehidroascorbato y dehidroascorbato utilizando como modelo biomimético estructural de ascorbato oxidasa a $[Cu_3(R, R - CPSE)_3(H_2O)_3] \cdot 8H_2O$.

4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Realizar la síntesis del compuesto trinuclear de cobre como modelo estructural de Ascorbato oxidasa, siguiendo el esquema de reacción propuesto por Avila- Torres y colaboradores en 2013.
- Determinar la estabilidad del ácido ascórbico a diferente pH, temperatura, fotodegradación y disolvente.
- Identificar la especie monodehidroascorbato y dehidroascorbato a 220 nm y 265 nm a partir de la reacción directa entre ácido ascórbico y peróxido de hidrógeno.
- Estimar el efecto del compuesto trinuclear como modelo ascorbato oxidasa frente a ácido ascórbico, utilizando HPLC con detector de UV-Vis.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. MATERIALES

5.1.1. Reactivos

Para la síntesis del compuesto trinuclear de cobre se utilizó Acetato de cobre dihidratado marca Merck con una pureza de 99,9% así mismo se empleó ligante R,R (-) H₂cpse proporcionado por el laboratorio 211, departamento de química inorgánica y nuclear de la facultad de química (UNAM). En la preparación de la fase móvil se utilizó Fosfato disódico y fosfato monosódico hidratado con una pureza de 99% y 99.9% respectivamente de la marca Merck, tetrabutilamonio hidrogeno sulfato con una pureza de 97% Simga Aldrich.

5.1.2. Materiales y equipos

Los equipos implementados para el desarrollo del presente trabajo se establecen en la siguiente tabla.

Tabla 4: Características instrumentales

| Nombre | Marca | Modelo | País |
|---|-------------------|---------------|----------------|
| Balanza analítica | Ohaus -Adventure | --- | Estados Unidos |
| Equipo Cromatografía Liquida de alta eficiencia | Hitachi | --- | Estados Unidos |
| Equipo de espectrofotometría UV-Visible | Thermo Scientific | Evolution 201 | Estados unidos |
| Material de Vidrio | Schott Duran | --- | Alemania |

5.1.3. Muestra de análisis

La población de estudio fue el reactivo ácido ascórbico analizado por Fisher Brand con las siguientes especificaciones: L(+)-Ascórbico, riqueza mínima 99.7 %, soluble en H₂O 0.01 %, pérdida por desecación 105 °C, 0.1 %, sulfato 20 ppm y cloruro 0.005 %.

5.1.4. Síntesis compuesto trinuclear.

El Compuesto trinuclear de cobre (II) se llevó a cabo a partir de una síntesis asincrónica simultánea. Esto implica la desprotonación del hidrógeno ácido del compuesto mononuclear de N-acetil R,R(-)H₂cpse (Sintetizado previamente por Y. Ávila-Torres) y la activación asociativa del mismo sobre la sal metálica de acetato de cobre, figura 12.

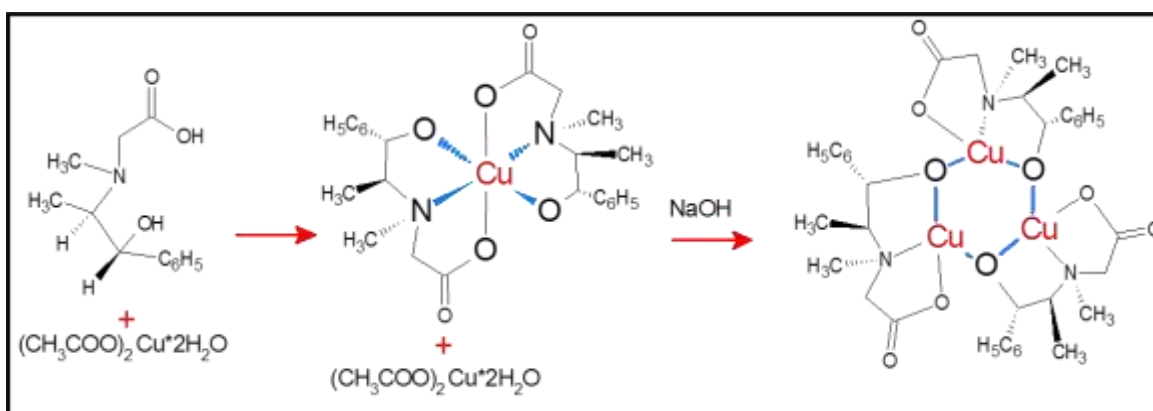


Figura 12: Esquema de reacción de síntesis del compuesto trinuclear de cobre(II).

5.2. METODOS

5.2.1. Síntesis compuesto trinuclear.

Se llevó a cabo la síntesis del compuesto trinuclear de cobre en dos pasos:

- Formación del compuesto mononuclear de cobre (II): Se pesaron 1 mmol de $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ la cual fue adicionada a 2 mmol del ligante R,R(-)Hcpse, utilizando como medio de reacción etanol. La mezcla se dejó en agitación por 20 min obteniendo un precipitado azul claro el cual fue caracterizado como compuesto mononuclear $[\text{Cu}(\text{R,R}(-)\text{Hcpse})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Los resultados de análisis elemental se colectaron en la Unidad de Estudios de Posgrado de la facultad de química (UNAM), ajustando el compuesto obtenido con los

porcentajes de carbono, nitrógeno e hidrógeno reportados previamente para este compuesto, tabla 5.

Tabla 5: Análisis Elemental del compuesto $[\text{Cu}(\text{R},\text{R}(-)\text{Hcpse})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

| % C | % H | % N |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| (Experimental/ teórico) | (Experimental/ teórico) | (Experimental/ teórico) |
| 56.20/55.40 | 6.2/6.3 | 5.3/5.4 |

- Formación del compuesto trinuclear de cobre (II): Se pesaron 0.65 mmol de $[\text{Cu}(\text{R},\text{R}(-)\text{H}_2\text{cpse})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y se adicionaron 0.65 mmol de acetato de cobre con 4 equivalentes de NaOH en metanol. Se obtuvo una disolución transparente de color azul oscuro, la cual fue dejada a refrigeración alrededor de 5°C por cuatro semanas; obteniendo cristales de color azul aptos para la difracción de rayos-X en forma romboédrica. Estos se filtraron y se recolectaron para análisis elemental, el cual se ajusta al reportado previamente para $[\text{Cu}_3(\text{R},\text{R}(-)\text{cpse})_3(\text{H}_2\text{O})_3] \cdot 8.5\text{H}_2\text{O}$, tabla 6.

Tabla 6: Análisis Elemental del compuesto $[\text{Cu}_3(\text{R},\text{R}(-)\text{cpse})_3(\text{H}_2\text{O})_3] \cdot 8.5\text{H}_2\text{O}$

| % C | % H | % N |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| (Experimental/ teórico) | (Experimental/ teórico) | (Experimental/ teórico) |
| 36.40/ 36.1 | 6.95 /6.87 | 3.20/3.45 |

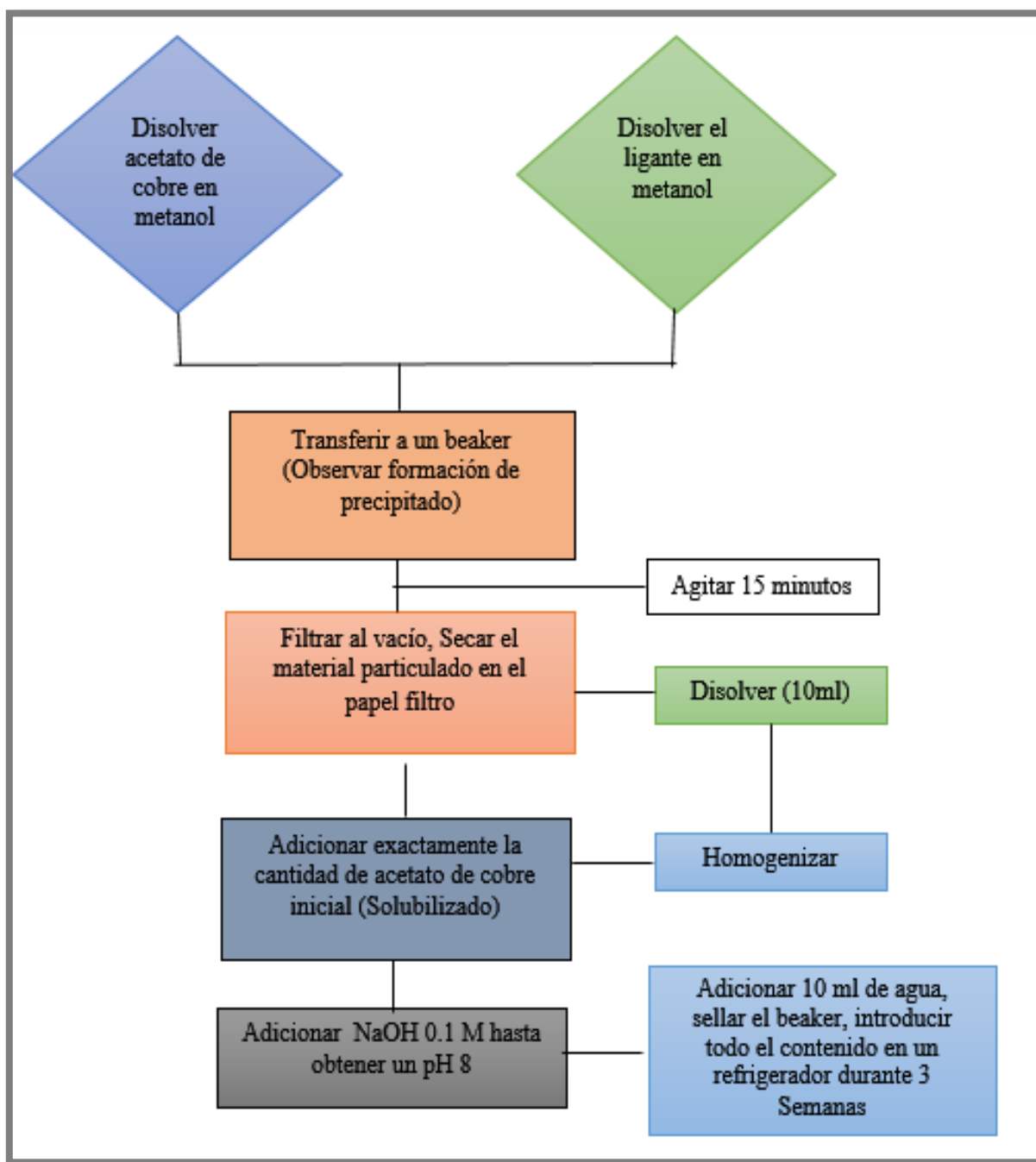


Figura 13:Proceso de síntesis compuesto trinuclear de cobre (Avila T. Yenny).

5.2.2. Cinética ácido ascórbico

5.2.2.1. Cinética Temperatura ambiente

Durante todo los procedimientos tanto de catálisis, como de seguimientos fotométricos se utilizó una concentración de 0,001 M en ácido ascórbico, para la determinación de la cinética se realizó bajo las mismas condiciones de concentración. Se prepara el patrón 0,001 M en etanol 95%, se lee en celda de cuarzo, se calibra el equipo de espectrofotometría UV-visible Evolution-201 para que realice la lectura cada dos minutos durante dos horas.

5.2.2.2. Cinética Influencia de la temperatura

Se realiza el mismo seguimiento planteado en el numeral anterior, el factor temperatura es uno de los que mayor dificultad aporta el seguimiento fotométrico de ácido ascórbico, por tanto se plantea realizar un seguimiento durante dos horas manteniendo la temperatura de la solución a 10 °C aproximadamente.

5.2.3. Catálisis del ácido ascórbico (Actividad antioxidante)

Para la determinación de la catálisis de ácido ascórbico (AA) en Acido Dihidroascorbico (DHA), se realizó mediante la siguiente metodología, con base en los objetivos planteados:

- Estabilidad del ácido ascórbico a diferente pH, temperatura, fotodegradación y disolvente.

Evaluación de las especies monodehidroascorbato y dehidroascorbato a partir de la reacción entre ácido ascórbico y peróxido de hidrógeno a 220 nm y 265 nm, utilizando diferentes medios de reacción básico, ácido y neutro. Es necesario considerar esta variable ya que el potencial redox de una semirreacción está directamente relacionado con el pH. Posteriormente, se realizó un seguimiento

por espectroscopia IR identificando las especies oxidadas y reducidas. En este sentido hay cambios estructurales considerables tales como:

El ácido ascórbico presenta una lactona (a), dos grupos enólicos (b), un alcohol primario (c) y un alcohol secundario (d); el grupo enólico es oxidado a la cetona respectiva cuando se lleva a cabo la oxidación con *ascorbato oxidasa*. La estructura de endiol promueve sus cualidades antioxidantes ya que los endoles pueden ser oxidados fácilmente a dicetonas, figura 14.

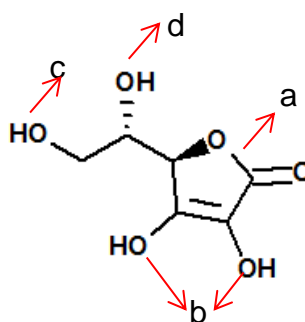


Figura 14: Grupos funcionales del ácido ascórbico.

En medio básico se obtiene la forma desprotonada estabilizando el enolato, especie que es estabilizada por el doble enlace adyacente.

El ácido ascórbico se interconvierte rápidamente en dos tautómeros de dicetona inestables por la transferencia del protón, 1,2- dicetona y 1,3 dicetona figura 15.

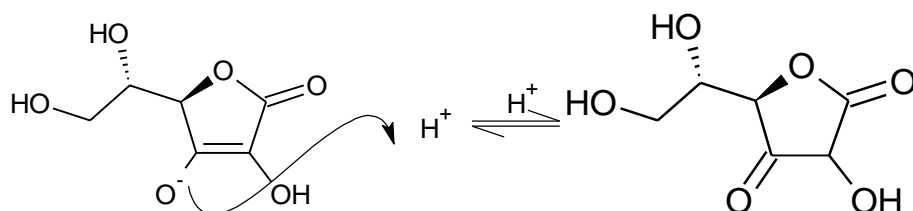


Figura 15 Tautomerismo en ácido ascórbico.

El intermedio monodehidroascorbato presenta un anillo de cinco miembros muy estable, el cual es producto de la interacción intramolecular (a). El grupo cercano lleva los electrones al átomo deficiente por efecto de grupo vecino. Cuando el ácido ascórbico reacciona con especies reactivas con oxígenos, estos se reducen a H_2O y se forma el monodehidroascorbato con un nuevo grupo cetona (b) producto de la oxidación de uno de los enoles.

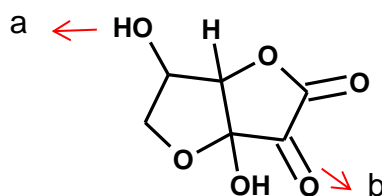


Figura 16: Estructura de Monodehidroascorbato.

Posteriormente, el grupo cetona es finalmente reducido a su forma alcohol en la especie dehidroascorbato. A estos cambios estructurales se les dio seguimiento por espectroscopia IR, utilizando el equipo de reflectancia total atenuada, lo cual permitió identificar el avance de las reacciones.

- Establecidas las condiciones adecuadas para la oxidación a las especies
- Monodehidroascorbato y dehidroascorbato, se llevó a cabo la adición del compuesto trinuclear como modelo *ascorbato oxidasa* frente al ácido ascórbico utilizando concentraciones del orden mM, en HPLC a 220 nm y 265 nm
- Finalmente se estima la actividad *ascorbato oxidasa* como mg de ácido ascórbico inyectado por min de degradación.

5.2.4. Cuantificación Ácido ascórbico catalizado.

Para la determinación de la concentración idónea de acción por parte del compuesto trinuclear de cobre se plantea la siguiente metodología

Se preparan 5 patrones de diferentes concentraciones de ácido ascórbico.

Tabla 7: Patrones Curva de calibración Ácido ascórbico

| Patrón | Conc. Ac. Ascórbico ppm |
|--------|----------------------------|
| 1 | 200 |
| 2 | 100 |
| 3 | 50 |
| 4 | 25 |

Los patrones para la curva de calibración son preparados con Etanol grado HPLC y son inyectados al sistema cromatografico para ser leídos a 265 nm.

5.2.5. Acción compuesto trinuclear de cobre

En 4 matraces de 5 mL son adicionados 0,5 ml de solución del compuesto trinuclear de cobre a el cual tiene una concentración de 500 ppm y son aforados con los patrones previamente realizados he inyectados nuevamente al sistema cromatográfico. El sistema estará calibrado para realizar lecturas a 265 nm, la diferencia correspondiente a la altura de los picos será entonces la cantidad de ácido ascórbico que el compuesto trinuclear de cobre cataliza. Todas las muestras, tanto los patrones iniciales como los patrones que contienen compuesto trinuclear fueron sometidas a baño de hielo, esto, pretendiendo mantener la temperatura aproximadamente a 10 °C.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Estabilidad del ácido ascórbico a diferente pH, temperatura, foto degradación y disolvente

El AA es muy sensible a la degradación. Numerosos factores influyen en los mecanismos degradativos, entre ellos el pH, la concentración de oxígeno, las enzimas, los catalizadores metálicos, la concentración inicial de AA y la relación AA- DHA.(Serra and Cafaro 2007).

6.1.1. Exposición Lumínica

Inicialmente se llevó a cabo un barrido espectral entre 200- 800 nm del AA en etanol, observando que la radiación lumínica afecta la estabilidad del ácido. En la figura siguiente se observa como AA es inestable sin protección de la luz. Se considera que la concentración de AA decae a razón de un 20% por hora sino se tienen en cuenta estos cuidados, (Wechtersbach et al. 2011).

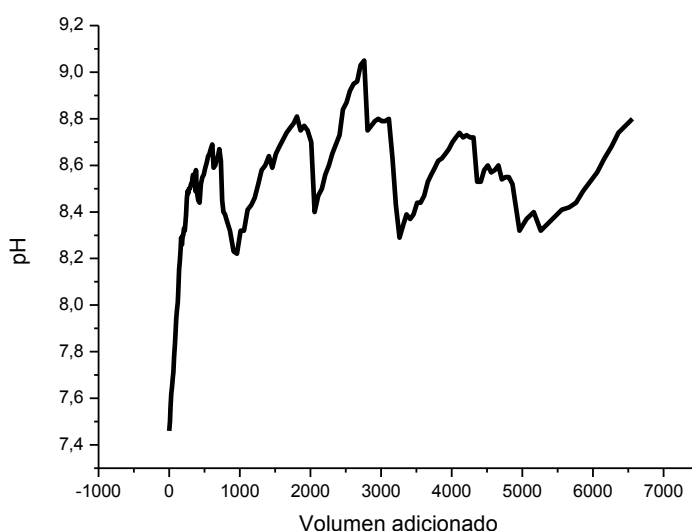


Figura 17: Ácido ascórbico interferencia lumínica.

6.1.2. Estabilidad con la temperatura de AA

La degradación de AA es susceptible a la temperatura. Se ha reportado en trabajos previos cinética de primer orden para la degradación en diferentes sistemas como pulpa de mango y uchuva entre otros, (Gutiérrez, Hoyos, and Páez 2007). En el ensayo realizado en este proyecto, se llevó a cabo la cinética a 10°C y TA, observando que a 10°C el proceso de degradación presenta una cinética de primer orden y el sistema adquiere estabilidad a 120 min.

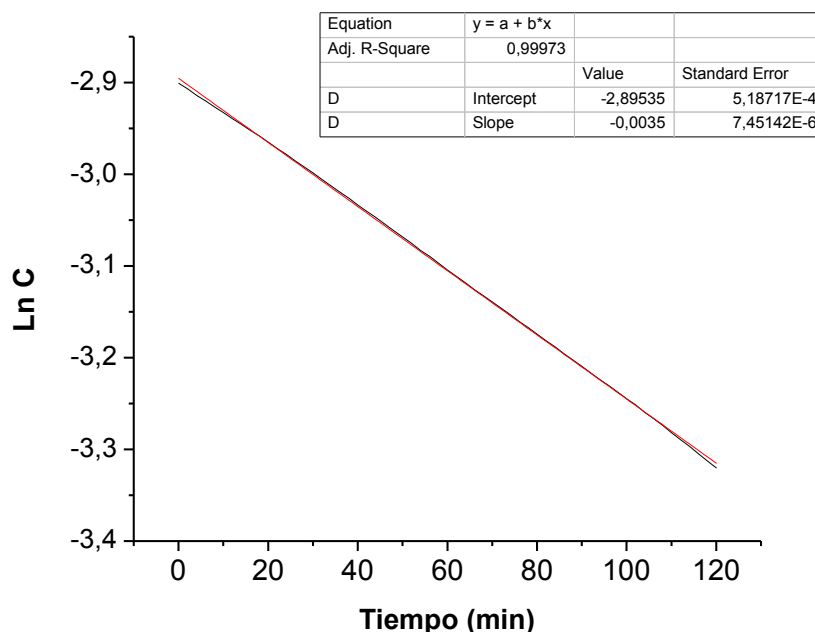


Figura 18: Curva cinética de AA con LnC vs. T.

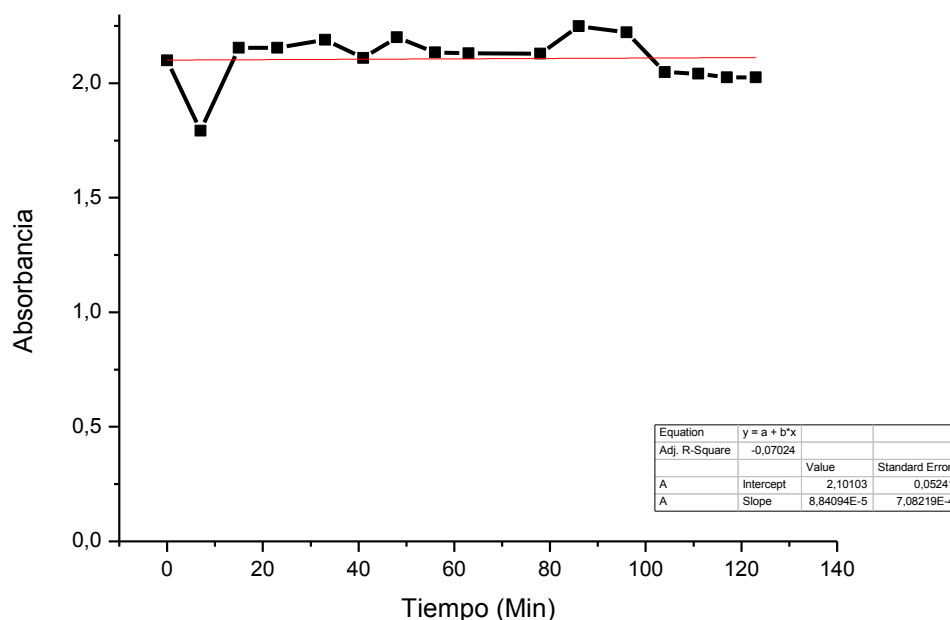


Figura 19: Cinética Ácido ascórbico a 10 °C.

6.1.3. Estabilidad con el pH.

El pH es una variable que se debe de controlar ya que el AA presenta tautomerismo. A pH básico la forma ionizada es más inestable que la estructura no ionizada. En caso de obtener un pH alto el dianión es la especie más inestable de AA. A continuación se muestra el espectro IR correspondiente a la estabilidad del AA a tres pH diferentes: ácido (presencia de ácido ortofosfórico, pH=3.0), base (presencia de bicarbonato de sodio, pH=8.0), neutro (presencia de buffer fosfato, pH=6.8). Adicional a este efecto, se variaron las relaciones estequiométricas (AA: Medio) con la finalidad de apreciar cualitativamente el efecto de la concentración sobre el desplazamiento en los respectivos equilibrios, figura 20, 21 22.

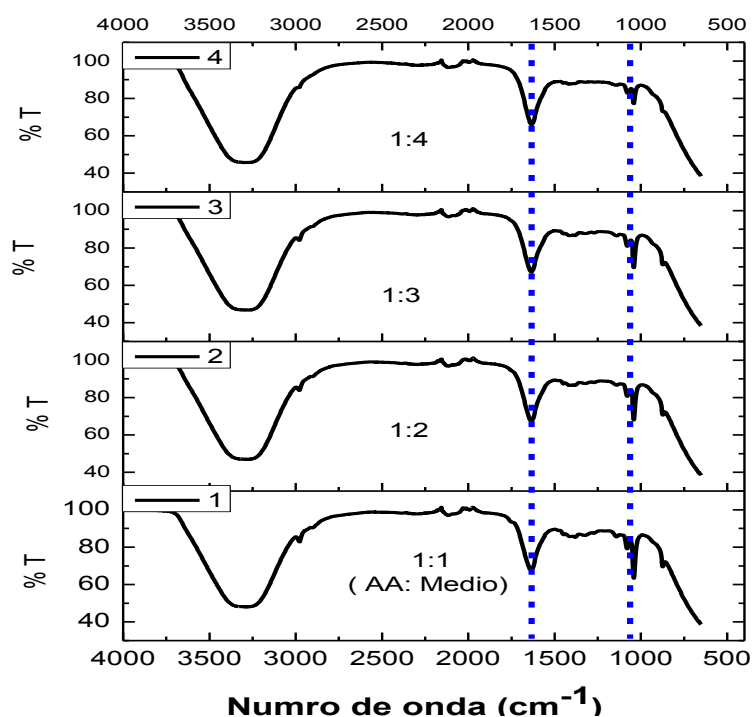


Figura 20: Medio neutro con buffer fosfato a $\text{pH}=6.4$.

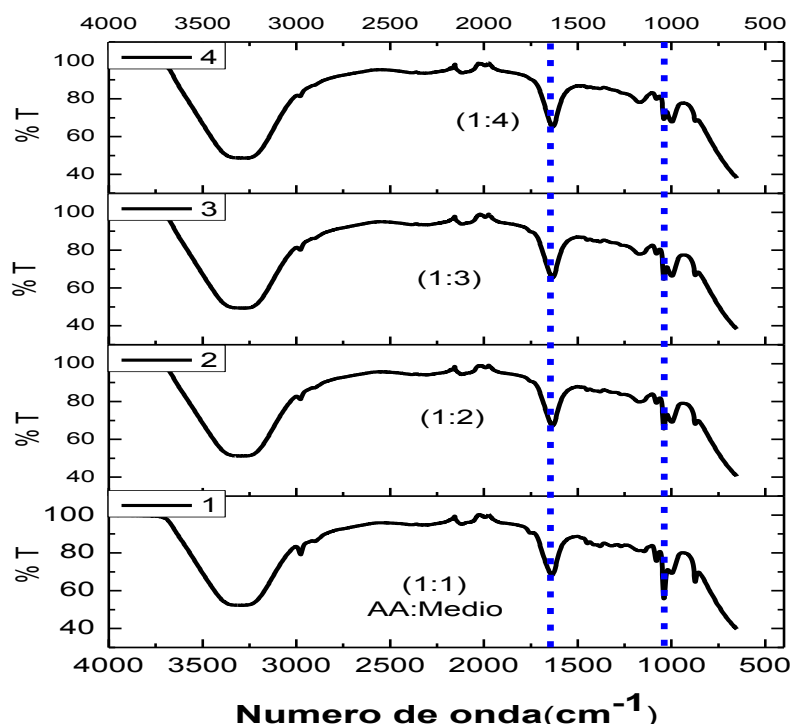


Figura 21: Medio ácido con ácido ortofosfórico a $\text{pH}=3.0$.

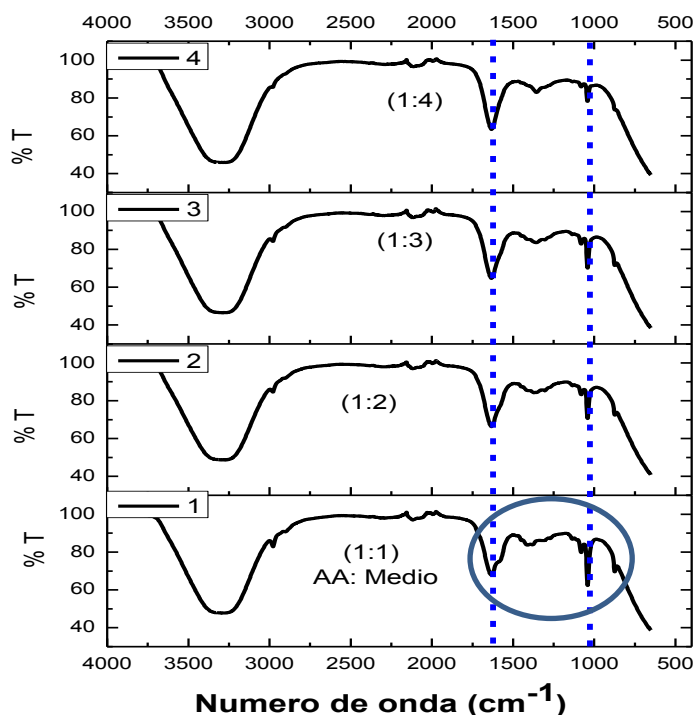


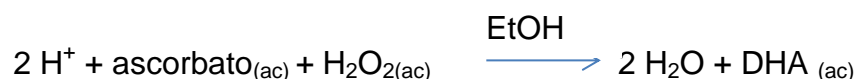
Figura 22: Medio básico con NaHCO_3 a $\text{pH}=8.0$.

Como era de esperarse el perfil que presenta mayor inestabilidad fue el ensayo a pH básico, por la presencia de AA ionizado al ser desprotonado. A pH ácido alrededor de $\text{pH}=3.0$ se observa estabilidad del AA en ácido ortofosfórico a bajas concentraciones de ácido. A medida que aumenta la concentración de ácido, se favorece la ruptura de la lactona y posterior descarboxilación. Así mismo, desaparece una de las vibraciones de los grupos cetona, como consecuencia de la ciclación de AA en los tres medios y la vibración C-O es susceptible al pH siendo más inestable en medio básico.

6.2. Determinación de las especies monodehidroascorbato y dehidroascorbato a partir de la reacción química con el agente oxidante H_2O_2 .

Como la finalidad es realizar un seguimiento espectrofotométrico de la reacción de oxidación de ácido ascórbico con el compuesto trinuclear, es necesario fijar un

blanco para determinar el comportamiento de las especies monodehidroascorbato y dehidroascorbato de forma independiente. Para lograr esto, se llevó a cabo una reacción de oxidación utilizando como agente al H_2O_2 el cual se reduce a H_2O y el AA se oxida a dehidroascorbato.



En espectroscopia IR, se observa una diferencia en el espectro de AA y la reacción oxidada con H_2O_2 .

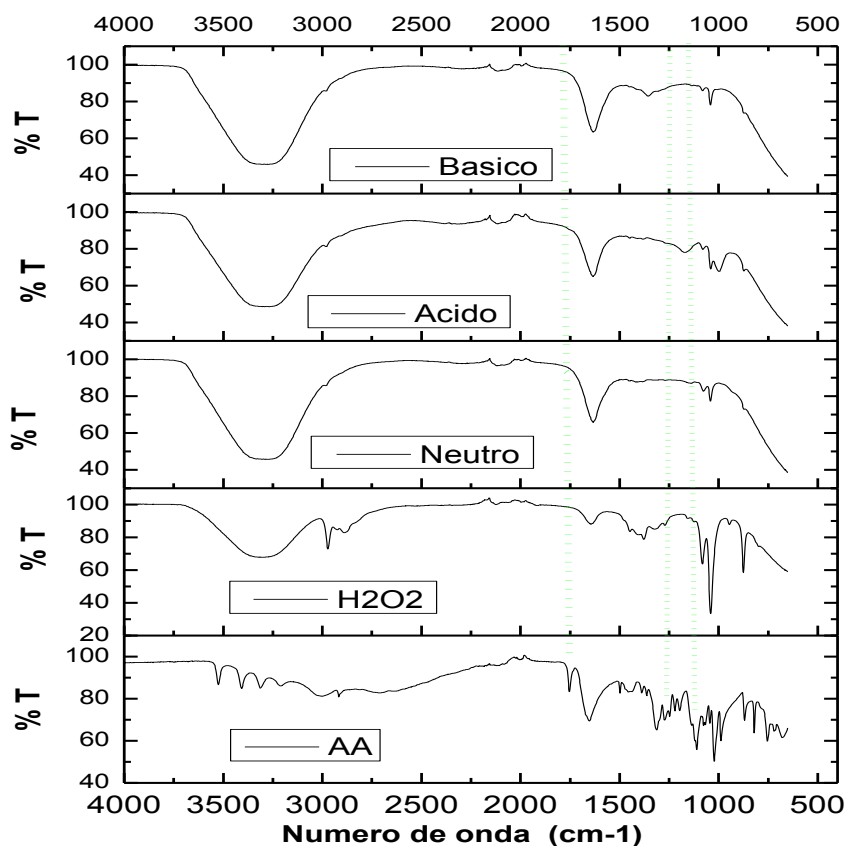


Figura 23: Espectro IR Ácido ascórbico comparación reacción con H_2O_2 .

Como se mencionó anteriormente el seguimiento de la reacción de oxidación (AA-DHA) está dado por la pérdida de la vibración alrededor de 1751 cm^{-1} y disminución de la intensidad de la banda alrededor de 1279 cm^{-1} . El H_2O_2 cataliza

la reacción y constituye un blanco para mostrar que en condiciones ácidas obtenemos espectros IR con condiciones similares. No fue posible inyectar en el equipo de HPLC las muestras con H₂O₂ ya que hubo fluctuaciones drásticas de la presión y no fue posible establecerlo como blanco en los perfiles cromatográficos.

6.3. Catálisis de AA a DHA utilizando el compuesto trinuclear de cobre (TC) como modelo funcional de *ascorbato oxidasa*.

Establecidas las condiciones anteriores de pH, temperatura y sensibilidad a la degradación por la radiación lumínica, se llevó a cabo el análisis de catálisis. Inicialmente se inyectó 20 µL de AA y se realizó un seguimiento a 265 nm (Banda de máxima absorción de AA) y 220 nm, (Banda de máxima absorción de DHA), con el fin de establecer el perfil cromatográfico, (Moeslinger et al. 1995)(Grindberg and Williams 2010). Posteriormente se estimó el área de los picos cromatográficos, deconvolucionando la envolvente del perfil, con el programa Origin 8.0, (Matemática, analyses multi peaks, integration), como se muestra en la figura 24. El tiempo de retención de AA a 265 nm fue asignado a t~3.2 min y el tiempo asignado para DHA a 220 nm fue t ~3.2. Los primeros resultados que se muestran, corresponden a la inyección de AA y TC en diferentes proporciones en condiciones de buffer para analizar la estabilidad.

Tabla 8: Condiciones sistema cromatografico HPLC

| Condiciones sistema HPLC | |
|------------------------------|--------------------------|
| Flujo | 0,6 mL/min |
| Temperatura Sistema ° C | 25 |
| Fase móvil | Buffer de fosfato pH 6.8 |
| Longitud de onda AA (nm) | 265 |
| Longitud de onda DHA (nm) | 220 |

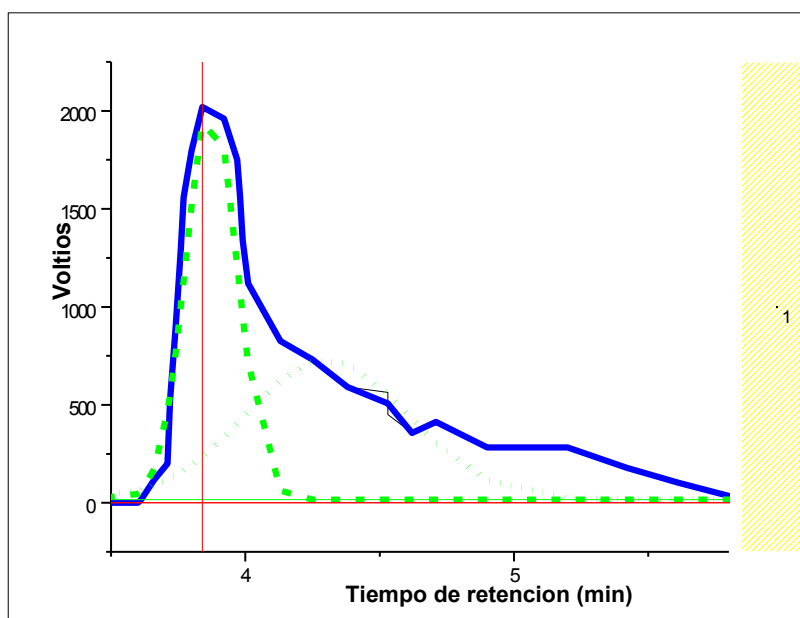
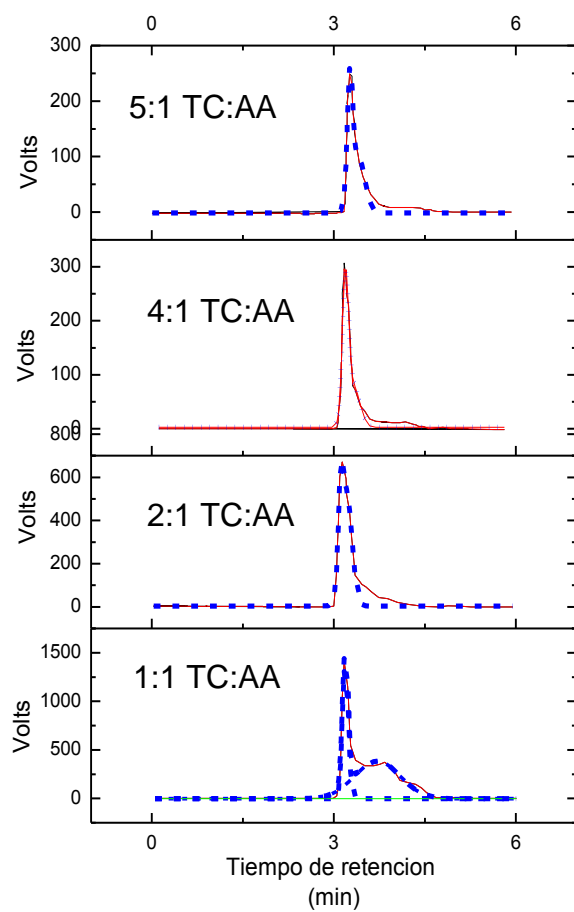
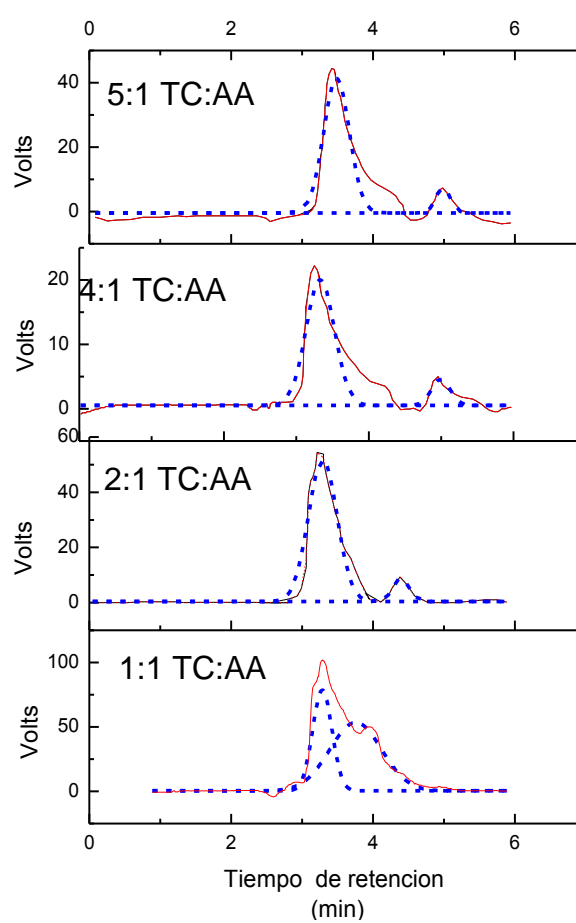


Figura 24: Deconvolución perfiles Cromatográficos.

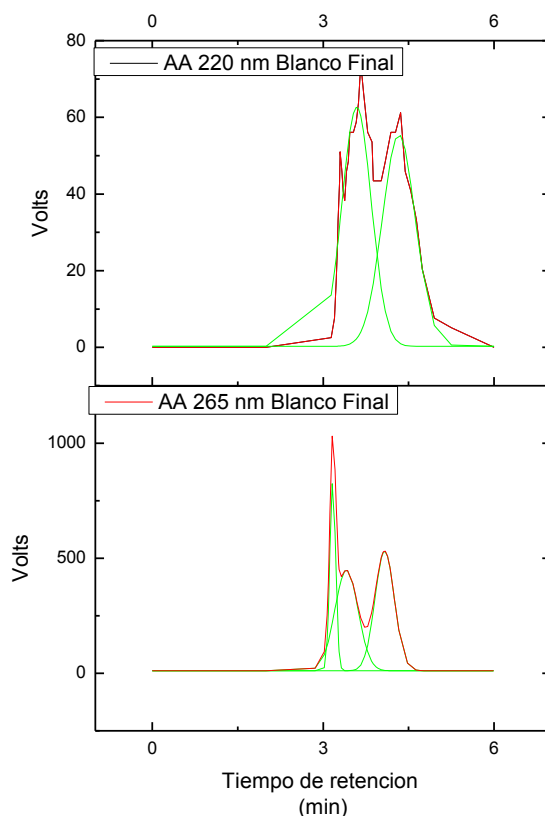
Deconvolución de la envolvente de los perfiles cromatográficos a 265 nm y 220 nm. Para establecer el efecto de TC en AA, se prepararon cinco soluciones de **TC** 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mL (500 ppm) y se adicionaron 176 ppm de AA a cada una de estas, aforando a 5 mL con etanol en medio ácido. Posteriormente se inyectaron 20 μ L de cada una de las mezclas al cromatógrafo líquido de alta eficiencia, adaptando la metodología de Shimada Yoshihiro y colaboradores, usando como fase móvil buffer fosfato. Se realizó el seguimiento a las longitudes de onda establecidas (220 y 265 nm) obteniendo los siguientes resultados, figura 25. Cabe resaltar que todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado y la gráfica corresponde al promedio de los valores en cada punto.



a)



b)



c)

Figura 25: Perfil cromatográfico correspondiente al efecto de TC sobre AA a a) 265 nm. b) a 220 nm, c) Control de AA.

El seguimiento a 265 nm muestra una disminución en la señal del detector alrededor de 3.2 min a medida que aumenta la proporción de trinuclear con respecto a AA. Las tablas con respecto a la integración del pico de mayor contribución, muestran el porcentaje de oxidación o conversión de AA a DHA estimado que aumenta de forma progresiva con el aumento del TC. En una relación 1:1 (TC:AA) el % inicial de disminución de área es sólo el 11.12 %. Sin embargo, en la proporción (5:1) es considerable la disminución de área en un 75 %. Adicionalmente, en el perfil cromatográfico a 220 nm, a medida que la proporción TC: AA aumenta, se favorece la formación de dos picos cromatográficos bien definidos, el primero con un tiempo de retención de 3.2 min

asociado a DHA y otro a 4.5 min asociado posiblemente a MDA. Cabe resaltar, que este método cromatográfico fue una adaptación del reporte literario (Yoshihiro and Sanae 2008), por ende no se encuentran definidos los tiempos de retención de AA, DHA y DHA. Así mismo, el patrón que se utilizaría como blanco producto de la reacción de oxidación con H_2O_2 generó inestabilidad en el equipo de HPLC.

Tabla 9: % de Oxidación en términos de relación de áreas (AA-DHA)/AA a 265 nm

| Lectura 265 | | |
|-------------|---------------|-------------------------------|
| Patrón | Pico1 Área | % Oxidación Área AA - Área |
| AA | 172.925 | |
| Cu 1:1 | 153,02 | 11.12 % |
| Cu 2:1 | 176,5 | ----- |
| Cu 4:1 | 67,52 | 60.96 % |
| Cu 5:1 | 42,3 | 75.4 % |

Posteriormente observando que el sistema era estable, se inyectaron cinco muestras. La primera, un control de AA a 265nm y 220 nm y las otras muestras relaciones (1:1, 2:1, 4:1, 5:1 TC:AA) en medio ácido y 10 °C. Estos análisis se realizaron por triplicado, figura 26; reportando el promedio de los perfiles cromatográficos. La asignación de los tiempos de retención bajo estas condiciones son: a 265 nm AA, $t_r = 2.6$ min; a 220 nm DHA, $t_r = 3.0$ min.

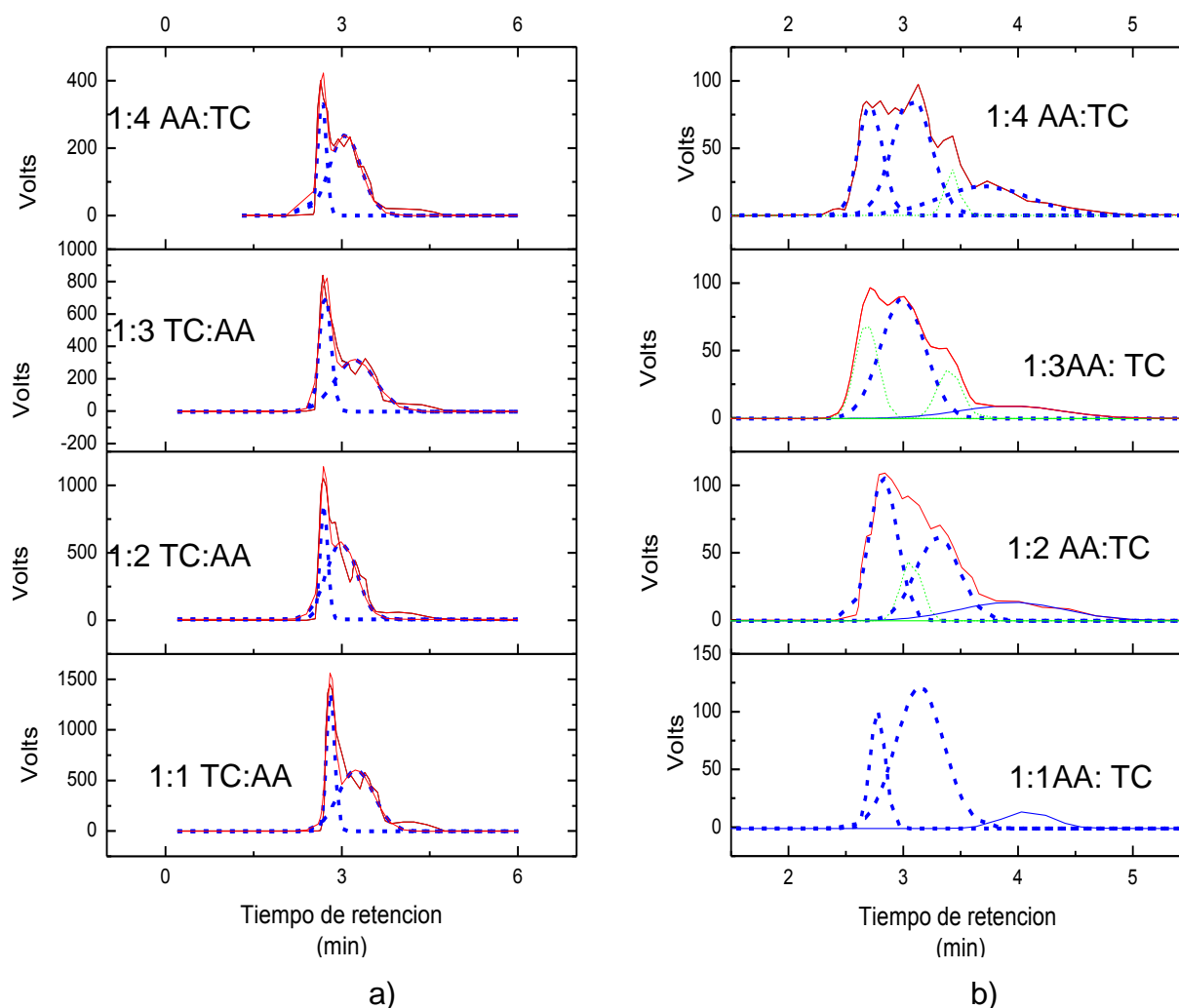


Figura 26: Perfil cromatográfico de la degradación de AA con TC a diferentes proporciones en condiciones óptimas. (Fase móvil: buffer fosfato, reacción estabilizada con ácido ortofosfórico, 10 °C, etanol como disolvente).

La deconvolución e integración de los picos característicos de AA y DHA a 265 nm y 220 nm se muestran en la tabla 10, estimando un % de oxidación con relación a la disminución de la señal a 265 nm y aumento a 220 nm.

Tabla 10: Relación de áreas en la oxidación de AA por efecto de TC en condiciones óptimas.

| Patrón | Lectura 265 nm | | Lectura 220 nm |
|--------|----------------|-------------|----------------|
| | Pico1 | % Oxidación | Pico2 |
| Cu 1:1 | 221,13 | ----- | 58,22 |
| Cu 2:1 | 182,33 | 17.5 % | 27,15 |
| Cu 4:1 | 167,68 | 24.17 % | 40,44 |
| Cu 5:1 | 69,73 | 68.46 % | 38,1 |

El medio ácido muestra cualitativamente la formación de DHA y MDA a 220 nm. Adicionalmente el porcentaje de oxidación estimado como la relación de áreas en función de TC, presenta una disminución gradual de AA a 265 nm.

La propuesta con respecto a los resultados anteriores, consiste en que el TC participa en uno de los tres procesos de oxidación que presenta el AA. La vía oxidativa catalizada en condiciones aeróbicas, en donde los iones metálicos del compuesto trinuclear de cobre posiblemente aceleran la velocidad de la reacción. Este mecanismo implica la formación de un complejo metal-anión que se combina con el oxígeno para dar un complejo metal-oxígeno-ligando, el cual se descompone rápidamente para dar el radical anión ascorbato ($AH\cdot$), el anión metálico original y HO_2 . Así el $AH\cdot$ reacciona ahora con el oxígeno y produce DHA. La velocidad de esta reacción dependerá de la concentración del catalizador metálico en presencia de oxígeno, tal como se observa en los cromatogramas ya que se observa una disminución gradual del % de área de AA con respecto al aumento de TC.

Para comprobar lo planteado anteriormente se llevó a cabo el siguiente estudio cinético que permite establecer el efecto del catalizador sobre AA.

6.4. Estudio cinético de AA con TC

Las condiciones anteriormente descritas, fueron utilizadas para llevar a cabo estudios cinéticos. Se preparó una solución relación (5:1; TC:AA) a pH ácido, fase móvil buffer fosfato, 10 ° C y se realizó un seguimiento por 2 horas cada 2 min a 220 nm y 265 nm. Posteriormente se cuantificó la concentración en cada tiempo y se obtuvieron las gráficas de $\ln C$ vs. t , $1/C$ vs. t y $1/C^2$ vs. t , figura 27,28 y 29.

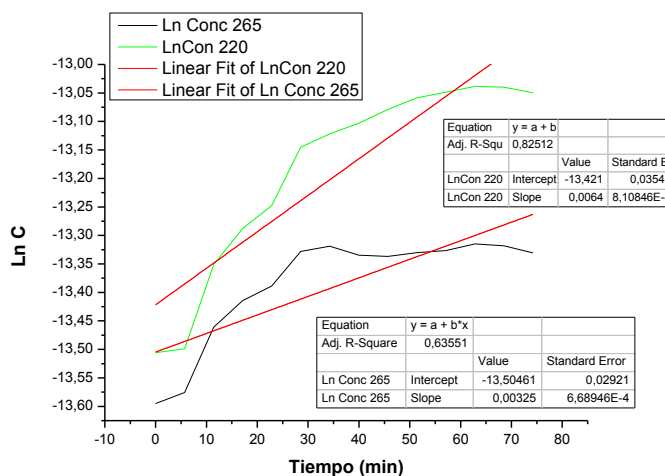


Figura 27: Cinética de la reacción de oxidación de AA a. $\ln C$ vs. t

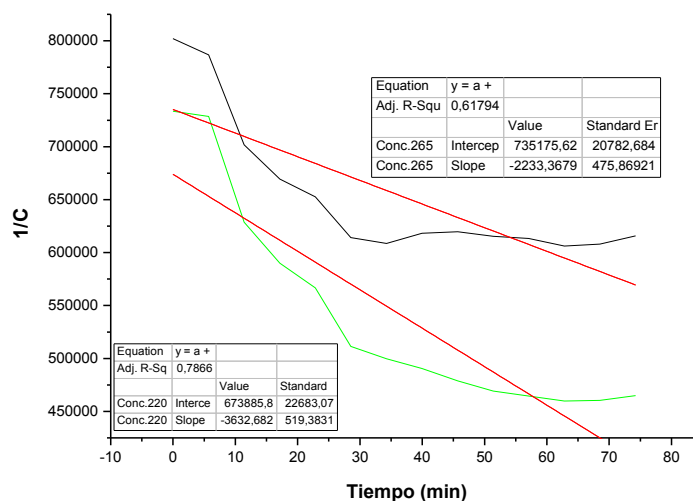


Figura 28: Cinética de la reacción de oxidación de AA a. $1/C$ vs. t

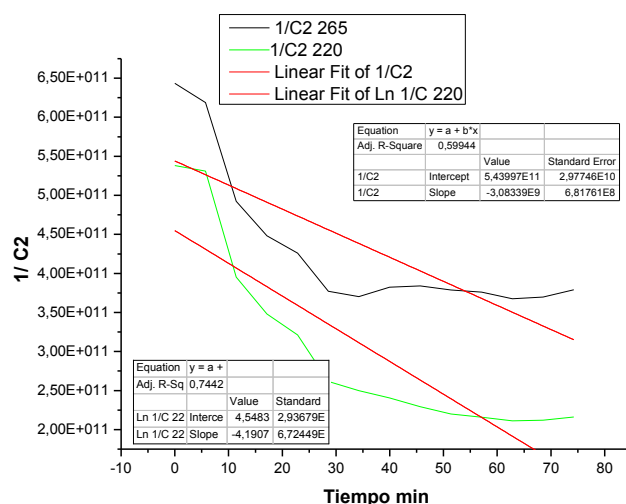


Figura 29: Cinética de la reacción de oxidación de AA . $1/C^2$ vs. t

Con base en este comportamiento, el valor de R más cercano a 1 la presenta la curva $\ln C$ vs. t , lo cual sugiere que el comportamiento sigue una cinética de primer orden, en donde la concentración del catalizador determina la velocidad de la reacción.

6.5. Cuantificación Ácido ascórbico.

Con la finalidad de cuantificar la cantidad de ácido ascórbico oxidado dada la disminución del pico cromatográfico a 220 nm, se llevó a cabo una curva de calibración en AA entre 25- 200 ppm, adicionando como estándar una solución TC constante de 0,5 mL. Cada patrón de AA disminuye la intensidad en el pico asignado para esta especie, conforme disminuye la concentración y el TC cataliza la reacción. A 25 ppm la conversión es más eficiente comparada con 200 ppm de AA. Esto se debe a que la concentración de AA inicial es más alta y el TC es menos eficiente, evidenciando la presencia de intermediarios inestables con tiempos de retención entre $t = 4.5 - 6$ min, figura 30 y 31.

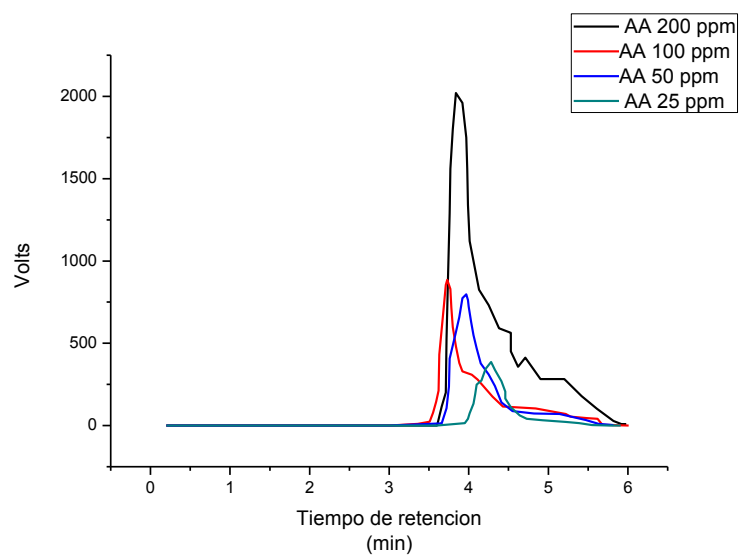


Figura 30: Relación tiempos de retención-área curva de calibración ácido ascórbico.

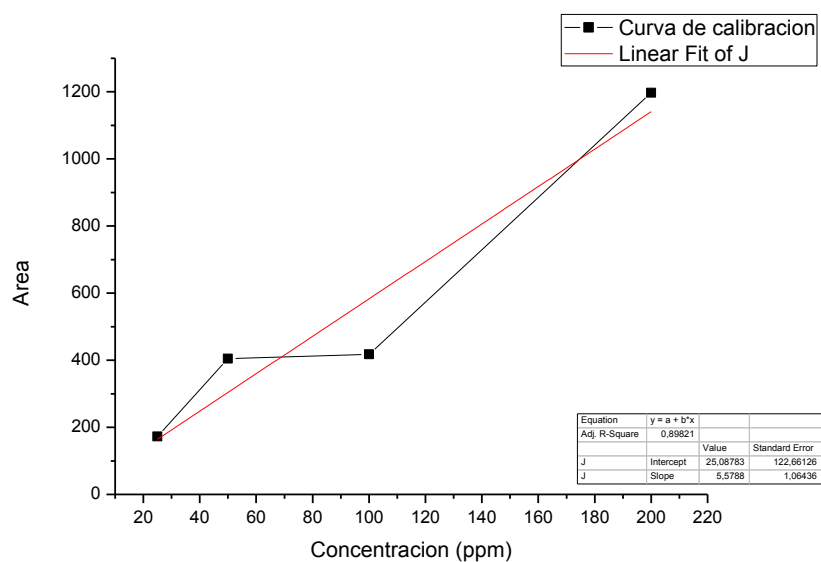


Figura 31: Concentración Vs Área Curva de calibración ácido ascórbico.

6.6. Parámetros de detección.

El estudio realizado utilizó intervalos de concentración del orden mM. Con base en esto, se preparó una solución relación (5:1; TC:AA) a pH ácido, fase móvil buffer fosfato, 10 ° C y se midió 15 veces en el detector de UV-Vis a 265 nm y 220 nm, tabla 10. A partir de estos datos, se verificó que el límite de detección y cuantificación se encuentran en el intervalo en el orden de 1×10^{-6} M, lo cual permite sugerir que el método utilizado es adecuado para estimar las conclusiones realizadas hasta el momento.

Tabla 11: Límite de detección y límite de cuantificación.

| Concentración 265 (M) | Concentración 220 (M) |
|--------------------------|--------------------------|
| 1,25E-06 | 1,36E-06 |
| 1,27E-06 | 1,37E-06 |
| 1,43E-06 | 1,59E-06 |
| 1,49E-06 | 1,69E-06 |
| 1,53E-06 | 1,76E-06 |
| 1,63E-06 | 1,96E-06 |
| 1,64E-06 | 2,00E-06 |
| 1,62E-06 | 2,04E-06 |
| 1,61E-06 | 2,09E-06 |
| 1,62E-06 | 2,13E-06 |
| 1,63E-06 | 2,15E-06 |
| 1,65E-06 | 2,18E-06 |
| 1,64E-06 | 2,17E-06 |
| 1,62E-06 | 2,15E-06 |

Concentraciones a 265 nm

$$\text{Promedio: } x = \frac{\text{Sumatoria de datos}}{\text{Numero de datos}} = 1,5461 \times 10^{-6}$$

$$\text{Limite de detección} = x + 3\sigma$$

$$1,5461 * 10^{-6} + 3(1,3238 * 10^{-7})$$

$$1,9609 * 10^{-6} \text{ M}$$

$$\text{Limite de Cuantificación} = x + 10\sigma$$

$$1,5461 * 10^{-6} + 10(1,3238 * 10^{-7})$$

$$2,9289 * 10^{-6}$$

Concentraciones a 220

$$\text{Promedio: } x = \frac{\text{Sumatoria de datos}}{\text{Numero de datos}} = 1,90310^{-6} \text{ M}$$

$$\text{Limite de detección} = x + 3\sigma$$

$$1,90310^{-6} + 3(2,93 * 10^{-7})$$

$$2,78 * 10^{-6} \text{ M}$$

$$\text{Limite de Cuantificación} = x + 10\sigma$$

$$1,90310^{-6} + 10(2,93 * 10^{-7})$$

$$4,83 * 10^{-6} \text{ M}$$

CONCLUSIONES

- Se logró ampliar los estudios realizados sobre el compuesto trinuclear de cobre sintetizado previamente por Ávila-Torres y colaboradores en el año 2013; en donde se evaluaron sus propiedades magnéticas y acoplamientos antiferromagnéticos a bajas temperaturas.
- El presente estudio permitió de forma preliminar estimar la actividad *ascorbato oxidasa* del compuesto trinuclear, encontrando que la concentración de ácido ascórbico es sensible a la oxidación de los productos DHA y MDA por efecto de la concentración del compuesto trinuclear. La disminución de la concentración de AA depende del aumento gradual de la concentración de TC bajo las siguientes condiciones: pH ácido, fase móvil: buffer fosfato y 10°C.
- Comparando el proceso de oxidación de AA con H_2O_2 y el obtenido con el modelo funcional de *ascorbato oxidasa*, se observó que el producto de la reacción de oxidación fue DHA, dado que la reacción en ambos casos fue seguida y comparada con espectroscopia IR. Por lo tanto, la disminución de la concentración de AA fue seguida a 265 nm y la formación de DHA a 220 nm.
- La técnica de HPLC con detector de UV-Vis es sensible a la escala de concentración en la cual se llevaron a cabo las medidas, con límites de detección y cuantificación estimados congruentes con concentración del orden micromolar.

BIBLIOGRAFIA

Al-Madhoun, Ashraf S., Maite Sanmartin, and Angelos K. Kanellis. 2003. "Expression of Ascorbate Oxidase Isoenzymes in Cucurbits and during Development and Ripening of Melon Fruit." *Postharvest Biology and Technology* 27(2):137–46.

Ávila-Torres, Yenny et al. 2013. "Structure and Magnetic Properties of copper(II) and cobalt(II) Coordination Compounds Derived from Optically Active Tridentate Ligands." *Polyhedron* 51(1):298–306.

Ávila-torres, Yenny, Lázaro Huerta, and Noráh Barba-behrens. 2013. "XPS-Characterization of Heterometallic Coordination Compounds with Optically Active Ligands." 2013.

Ballesteros, Diego. 2013. "Enlaces Inorganicos." Retrieved September 9, 2015 (<http://datateca.unad.edu.co/contenidos/401540/exe/presentacin.html>).

Benavente, Susana. 2007. "Química de Coordinación de Iones Metálicos En Estado de Oxidación II Derivados de A - Hidroxicarboxilatos."

Casella, Luigi et al. 1999. "Inhibitor Binding Studies on Ascorbate Oxidase." 186:619–28.

Deutsch, J. C. 2000. "Dehydroascorbic Acid." *Journal of chromatography. A* 881(1-2):299–307.

Estupiñan, Carlos A. 2012. "Estudio Comparativo Del Contenido de Acido Ascorbico Del Musilago de Aloe Vera Entre Diferentes Cultivos Del Departamento de Risaralda Por Cromatografia de Alta Eficiencia."

Grindberg, Thomas and Kristy Williams. 2010. "Vitamin C Quantification Using Reversed-Phase Ion-Pairing HPLC." 1:19–23.

Gutiérrez, Tania M., Olga L. Hoyos, and Y. Martha I. Páez. 2007. "Ascorbic Acid Determination in Gooseberry (*Physalis Peruviana* L) for High Performance Liquid Chromatography." 5:70–79.

Health and Consumers Directorate - General. 2003. "European Union Register of Feed Additives." (1831):512.

Herrera, Palmira. 2006. "Análisis De La Actividad De Ascorbato Oxidasa Durante El Desarrollo de La Plata de Frijol."

Hidalgo, A. and J. A. Gonzalez-Reyes. 1989. "Ascorbate Free Radical Enhances Vacuolization in Onion Root Meristems." *Plant, Cell and Environment* 12(4):455–60. Retrieved August 24, 2015 (<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3040.1989.tb01962.x>).

Horemans, Nele, Christine H. Foyer, and Han Asard. 2000. "Transport and Action of Ascorbate at the Plant Plasma Membrane." *Trends in Plant Science* 5(6):263–67.

Latham, Michael C. 2002. "NUTRICIÓN HUMANA EN EL MUNDO EN DESARROLLO." Retrieved September 30, 2015 (<http://www.fao.org/docrep/006/w0073s/w0073s00.htm>).

Mancisidor, Walter Alberto. 2013. "Estudio Magnetico de Sistemas Polimetalicos de Metales de La Primera Serie de Transicion."

María, José and Hernández Pérez. 2005. "Cromatografía Liquida de Alta Eficiencia." 49–62.

Moeslinger, T., M. Brunner, I. Volf, and P. G. Spieckermann. 1995. "Spectrophotometric Determination of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid." *Clin Chem* 41(8 Pt. 1):1177–81.

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology. 2015. "Spectral Database for Organic Compounds SDBS." Retrieved April 15, 2015 (http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi).

Pastori, Gabriela M. et al. 2003. "Leaf Vitamin C Contents Modulate Plant Defense Transcripts and Regulate Genes That Control Development through Hormone Signaling." *The Plant cell* 15(4):939–51. Retrieved October 9, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=152340&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).

Perez, Guillermo. 2008. "Ácido Ascórbico: Nombre Común, Características, Propiedades." Retrieved September 10, 2015 (<http://www.acidoascorbico.com/>).

Pignocchi, Cristina and Christine H. Foyer. 2003. "Apoplastic Ascorbate Metabolism and Its Role in the Regulation of Cell Signalling." *Current Opinion in Plant Biology* 6(4):379–89.

Plöchl, M., T. Lyons, J. Ollerenshaw, and J. Barnes. 2000. "Simulating Ozone Detoxification in the Leaf Apoplast through the Direct Reaction with Ascorbate." *Planta* 210(3):454–67. Retrieved September 30, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10750904>).

Quattrocchi, Oscar and Saras Abelaira de. 1992. "Introducción a La HPLC Aplicación Y Práctica." Retrieved September 4, 2015 (<http://es.scribd.com/doc/215256226/Introduccio-n-a-la-HPLC-Aplicacio-n-y-Practica-O-A-Quattrocchi-S-A-de-Andrizzi-R-F-Laba#scribd>).

Rucker, Robert B., James Morris, and Andrea J. Fascetti. 2008. "Chapter 23 - Vitamins." *Clinical Biochemistry of Domestic Animals (Sixth Edition)* 695–730. Retrieved (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123704917000234>).

Serra, Horacio Marcelo and Thamara Analía Cafaro. 2007. "Ácido Ascórbico : Desde La Química Hasta Su Crucial Función Protectora En Ojo Ascorbic Acid : From Chemistry to Its Crucial R Esumen." *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 41(4):525–32.

Sevilla, Repositorio RODAS universidad de Sevilla. n.d. "Cromatografía de Líquidos HPLC." Retrieved August 24, 2015 (<http://laboratorioteccnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/cromatografa-de-liquidos-hplc>).

Smirnoff, Nicholas. 2000. "Ascorbic Acid: Metabolism and Functions of a Multifaceted Molecule." *Current Opinion in Plant Biology* 229–35.

Wechtersbach, Luka, Tomaž Polak, Nataša Poklar Ulrih, and Blaž Cigić. 2011. "Stability and Transformation of Products Formed from Dimeric Dehydroascorbic Acid at Low pH." *Food Chemistry* 129(3):965–73.

Wilson, John X. 2002. "The Physiological Role of Dehydroascorbic Acid." *FEBS Letters* 527(1-3):5–9.

Yoshihiro, Shimada and Ko Sanae. 2008. "Ascorbic Acid and Ascorbic Acid Oxidase in Vegetables *." *Chugojugaken Journal* 7:7–10.